



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Prevalência, diversidade genética e resistência a antibióticos de *Arcobacter* spp.

Ana Sofia Vicente Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Doutora Susana Ferreira

Coorientadora: Prof^a Doutora Fernanda Domingues

Covilhã, outubro de 2016

Dedicatória

Ao meu avô, Teodoro.

Agradecimentos

Após um ano em que nem sempre foi fácil continuar esta aventura, cabe-me agora a altura de agradecer a quem permitiu e me ajudou a terminá-la de cabeça erguida e com um sentimento de satisfação e orgulho próprio.

Em primeiro lugar, o meu maior e mais sincero agradecimento à Doutora Susana Ferreira, que para mim desempenhou múltiplos papéis e não só o de orientadora deste trabalho. Todo o conhecimento que me transmitiu, apoio, constante preocupação e incentivo diário fizeram com que eu me conseguisse superar, dia após dia mesmo quando a frustração e vontade de desistir se apoderavam de mim. Não tenho palavras que descrevam completamente a sua importância durante este ano não só a nível académico como também a nível pessoal. Mostrou-me que sou capaz de enfrentar qualquer obstáculo que me tente travas. Não poderia ter escolhido melhor pessoa para partilhar esta etapa da minha vida, e por isso estou-lhe genuinamente e eternamente grata.

À Professora Doutora Fernanda Domingues, o meu muito obrigada pela sua partilha de experiência, conselhos e disponibilidade que me foi prestada.

À Adriana, minha companheira de laboratório, conselheira e agora amiga.

Aos meus verdadeiros amigos que por várias vezes acreditaram mais em mim do que eu própria, não me deixando baixar os braços, e me secaram as lágrimas quando foi necessário fazendo-me sorrir logo de seguida.

Aos meus pais e irmã não só tenho que agradecer como pedir desculpa por todas as vezes que fui injusta para convosco devido ao cansaço e pressão sentida. Sou quem sou graças a vocês, e nunca conseguirei expressar a gratidão e o orgulho que tenho em vocês e em nós enquanto família.

À minha avó que mesmo sem perceber o que eu faço sinto que tem orgulho em mim, e é a Rainha da minha vida.

Por fim, agradeço ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde e à Universidade da Beira Interior por permitirem a realização deste trabalho de investigação. O meu percurso acaba aqui, mas espero de alguma maneira ter deixado a minha marca.

Resumo

O género *Arcobacter* é constituído por 23 espécies até agora reconhecidas, e tem vindo a ser isolado a partir dos mais diversos ambientes e hospedeiros, tais como animais de consumo humano, alimentos e superfícies de processamento alimentar, águas ou amostras clínicas humanas, sendo considerado um agente patogénico emergente de origem alimentar com a capacidade de provocar doença quer em humanos quer em animais. A sua ampla distribuição e elevada prevalência em alimentos de consumo humano é motivo de preocupação, pois a ingestão destes alimentos e água contaminada é considerada a principal via de transmissão de *Arcobacter* spp. a humanos. Por outro lado, a elevada taxa de resistência a diversas classes de antibióticos pode colocar em risco o tratamento eficaz de possíveis infeções causadas por *Arcobacter*. Assim, considerando que ainda existem poucos estudos relativos à distribuição de *Arcobacter* em alimentos, mas também referentes à resistência desta bactéria, os objetivos deste trabalho foram analisar a prevalência de *Arcobacter* spp. em diversos alimentos, identificar a diversidade genética entre os isolados e avaliar a sua resistência a 9 antibióticos normalmente utilizados no tratamento de infeções por este microrganismo. Para tal procedeu-se a diversas amostragens em comércio a retalho nos concelhos da Covilhã e Fundão durante o período de um ano, tendo sido depois analisada a presença e prevalência de *Arcobacter* spp. nas diferentes amostras. Após o isolamento e identificação molecular dos isolados, estes foram genotipados recorrendo ao uso de *Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction* (ERIC-PCR), de forma a avaliar a sua variabilidade genética, seguindo-se por uma avaliação da sua resistência aos diferentes antibióticos. Os resultados demonstraram uma elevada percentagem de contaminação dos alimentos analisados por *Arcobacter* spp., observando-se uma discrepância entre os valores de prevalência quando feita a identificação molecular diretamente aos meios de enriquecimento (72,2 %) e através de isolamento a partir das amostras (47,0 %). Relativamente ao isolamento, nas diferentes categorias alimentares em estudo alcançaram-se valores de 28,6 % para os vegetais embalados; 68,0 % para carnes de aves de capoeira; 37,5 % para carnes de porco; 43,8 % para carnes de vaca; 56,0 % para amostras de peixes, e 100% para uma amostra de mistura de carnes de vaca e porco. Foi ainda observada uma grande heterogeneidade genética entre os isolados, registando-se 103 perfis genéticos diferentes entre os isolados provenientes das 54 amostras. A genotipagem dos isolados demonstrou ainda a possível existência de contaminação cruzada entre diferentes amostras. Quando avaliada a resistência a antibióticos, observou-se multiresistência para 94 dos 106 isolados avaliados. Assim, concluiu-se que o género *Arcobacter* se encontra amplamente distribuído em amostras alimentares, apresentando heterogeneidade genética significativa entre os isolados, tal como elevada resistência a diversos antibióticos.

Palavras-chave

Arcobacter spp., alimentos, prevalência, diversidade genética, resistência antimicrobiana

Abstract

The genus *Arcobacter* currently includes 23 recognized species, and has been isolated from a wide range of hosts and environments such as food and food processing surfaces, water, or human clinical samples. It is considered a foodborne emerging pathogen with ability to cause disease among humans and animals. The wide distribution and high prevalence of *Arcobacter* in food is a significant concern, since consumption of contaminated food and water is considered the most probable route of transmission of *Arcobacter* spp. to humans. High level of resistance to several antibiotics has been demonstrated, which may threaten the effective treatment of infections caused by this genus. Considering that there are still few studies analysing the distribution of *Arcobacter* spp. in food and also the resistance of these bacteria to antibiotics, the objectives of this work were to evaluate the prevalence of *Arcobacter* spp. in different food products, to characterize the genetic diversity among the isolates and to assess the resistance to 9 antibiotics commonly used to treat infections by this microorganism. Therefore, food samples were collected in retail shops at Covilhã and Fundão during one year, which were then tested for the presence and prevalence of *Arcobacter* spp.. After isolation and molecular identification of the isolates, these were genotyped using Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR), followed by an assessment of their resistance to different antibiotics. The results demonstrated a high contamination of food by *Arcobacter* spp., being observed a discrepancy between the prevailing values when the molecular detection was applied to enrichment broth (72.2 %) versus when the isolation methodology was performed (47.0 %). Regarding isolation, prevalence values of 28.6% for packaged vegetables, 68.0 % for poultry meat, 37.5 % for pork, 43.8 % for beef, 56 % fish samples, and 100 % for a single sample constituted by two different types of meat were obtained. A large genetic heterogeneity among the isolates was also observed, revealing 103 different genetic profiles among isolates from 54 samples. Nonetheless, genotyping of the isolates showed a possible cross-contamination between food samples. Concerning to antibiotic resistance, multiresistance was observed for 94 of the 106 analyzed strains. In conclusion, the *Arcobacter* genus was widely distributed among the collected food samples, showing a high genetic heterogeneity and high resistance to several antibiotics.

Keywords

Arcobacter spp., food, prevalence, genetic diversity, antimicrobial resistance

Índice

Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Taxonomia do género <i>Arcobacter</i>	2
1.2 Características gerais do género <i>Arcobacter</i>	5
1.3 Importância clínica e veterinária do género <i>Arcobacter</i>	7
1.3.1 Humanos	7
1.3.2 Animais	9
1.4 Vias de transmissão	10
1.4.1 Consumo de água contaminada	10
1.4.2 Consumo de alimentos contaminados	11
1.4.3 Transmissão pessoa-pessoa	11
1.4.4 Contacto com animais domésticos e selvagens	12
1.4.5 Transmissão animal-animal	12
1.5 Distribuição de <i>Arcobacter</i> spp.	12
1.5.1 <i>Arcobacter</i> em alimentos de origem animal	13
1.5.2 <i>Arcobacter</i> em alimentos de comércio a retalho e ambientes de processamento alimentar	14
1.6 Isolamento e identificação de <i>Arcobacter</i> spp.	15
1.6.1 Isolamento	15
1.6.2 Detecção e identificação de <i>Arcobacter</i> spp. baseada em métodos moleculares	17
1.7 Genotipagem e diversidade genética	18
1.8 Resistência a antimicrobianos	20
Capítulo 2: Objetivos	23
Capítulo 3: Materiais e Métodos	25
3.1 Estirpes de referência	25
3.2 Armazenamento das estirpes	25
3.3 Recolha das amostras alimentares	25
3.4 Enriquecimento das amostras alimentares	26
3.5 Isolamento de <i>Arcobacter</i> spp. a partir das amostras enriquecidas	26
3.6 Identificação presuntiva dos isolados	27

3.7 Detecção molecular de <i>Arcobacter</i> spp.	27
3.8 Genotipagem dos isolados	28
3.9 Suscetibilidade antimicrobiana.....	29
Capítulo 4: Resultados e Discussão	33
4.1 Isolamento, caracterização e identificação molecular das amostras.....	33
4.2 Genotipagem e diversidade genética dos isolados	41
4.3 Resistência a antibióticos das estirpes isoladas	45
Capítulo 5: Conclusões.....	53
Perspetivas Futuras.....	55
Bibliografia.....	57
Anexos	69

Lista de Figuras

Figura 1: Número de publicações ao longo dos anos em revistas e jornais científicos. Pesquisa feita pelos autores utilizando a palavra-chave: " <i>Arcobacter</i> " tendo como base de dados o PubMed.	1
Figura 2: Árvore filogenética das diferentes espécies do género <i>Arcobacter</i> , tendo por base a similaridade da sequência do gene rRNA 16S.	4
Figura 3: Representação gráfica da distribuição global de <i>Arcobacter</i> em alimentos e águas	13
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de acordo com Gonzalez et al. (2014) para identificação de <i>Arcobacter</i> spp. nas diferentes amostras.....	37
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do mPCR descrito por Houf et al. (2000) para identificação e diferenciação entre três espécies: <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> e <i>A. skirrowii</i>	38
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos de amplificação do mPCR descrito por Doudah et al. (2010) de diferentes amostras/isolados.	38
Figura 7: Padrões dos perfis genéticos dos isolados após genotipagem por ERIC-PCR.	43
Figura 8: Comparação entre os isolados com base na sua similaridade genética	44

Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies de <i>Arcobacter</i> propostas e aceites por ano e origem do isolado.	3
Tabela 2: Características fenotípicas das 23 espécies reconhecidas de <i>Arcobacter</i> spp.....	6
Tabela 3: Sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados.	28
Tabela 4: Antibióticos usados na avaliação da suscetibilidade antimicrobiana das estirpes. ...	30
Tabela 5: Pontos de corte de resistência dos diferentes antibióticos testados.	31
Tabela 6: Prevalência de <i>Arcobacter</i> spp. nas amostras recolhidas separadas por diferentes categorias alimentares, recorrendo a deteção molecular aplicada aos meios de enriquecimento, e usando cultura em paralelo seguida de identificação molecular dos isolados.	35
Tabela 7: Distribuição das espécies dos isolados de <i>Arcobacter</i> pelas diferentes categorias alimentares.	40
Tabela 8: Diversidade genética entre os isolados de <i>Arcobacter</i> spp. nas diferentes categorias alimentares.	41
Tabela 9: Diversidade genética das diferentes espécies de <i>Arcobacter</i> isoladas.	42
Tabela 10: Suscetibilidade antimicrobiana de <i>Arcobacter</i> spp. isolado a partir amostras alimentares recolhidas em comércio a retalho.....	46
Tabela 11: Distribuição da resistência antimicrobiana de 106 estirpes de <i>Arcobacter</i> isoladas a partir amostras alimentares recolhidas em comércio a retalho.	48
Tabela 12: Perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes selecionadas.	50

Lista de Acrónimos

AB - *Arcobacter Broth*

AFLP - *Amplified fragment length polymorphism*

BA - *Blood Agar*

BHI - *Brain Heart Infusion*

CAT - Cefoperazona, Anfotericina B e Teicoplanina

CMI - Concentração mínima inibitória

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

dNTPs - Desoxirribonucleótidos trifosfato

EMJH - *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris*

ERIC-PCR - *Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction*

EUCAST - *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*

ICMSF - *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

MHA - *Müller-Hinton Agar*

mPCR - *Multiplex polymerase chain reaction*

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - pares de bases

PCR - *Polymerase chain reaction*

PFGE - *Pulsed-field gel electrophoresis*

RAPD-PCR - *Random amplified polymorphic DNA-PCR*

Rpm - Rotações por minuto

rRNA - *Ribosomal ribonucleic acid*

UPGMA - *Unweighted pair group method using arithmetic averages*

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

Capítulo 1: Introdução

O aumento do número de relatos de detecção e isolamento de espécies de *Arcobacter* em alimentos, ambiente de processamento alimentar e águas de consumo humano, tal como a associação dos membros deste género a doenças em humanos e animais, tem vindo a reforçar a relevância dada a este microrganismo como um perigo para a segurança alimentar. *Arcobacter* é atualmente considerado um patogénico de origem alimentar emergente e por isso um problema de saúde pública (Atabay, Wainø and Madsen 2006). Embora o conhecimento sobre a patogenicidade relacionada com esta bactéria seja ainda limitado (Ho, Lipman and Gaastra 2006), as espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* têm vindo a ser associadas a várias doenças quer em humanos como em animais, nomeadamente enterites (Collado and Figueras 2011). A sua presença tem sido reportada em diversas fontes, quer ambientais, alimentares, animais e humanas (Ferreira et al. 2013). No entanto, a falta de metodologias padronizadas e adequadas para a sua detecção, isolamento e identificação podem influenciar os dados reais relativos à distribuição desta bactéria nos diferentes meios (Vandenberg et al. 2004). A incidência de estudos realizados até setembro de 2014 relacionados com *Arcobacter* spp. é visível na Figura 1, podendo observar-se um aumento significativo no número de publicações relacionadas com este género ao longo do tempo (Hsu and Lee 2015), sendo que desde esse período até ao presente foram publicados mais 106 trabalhos.

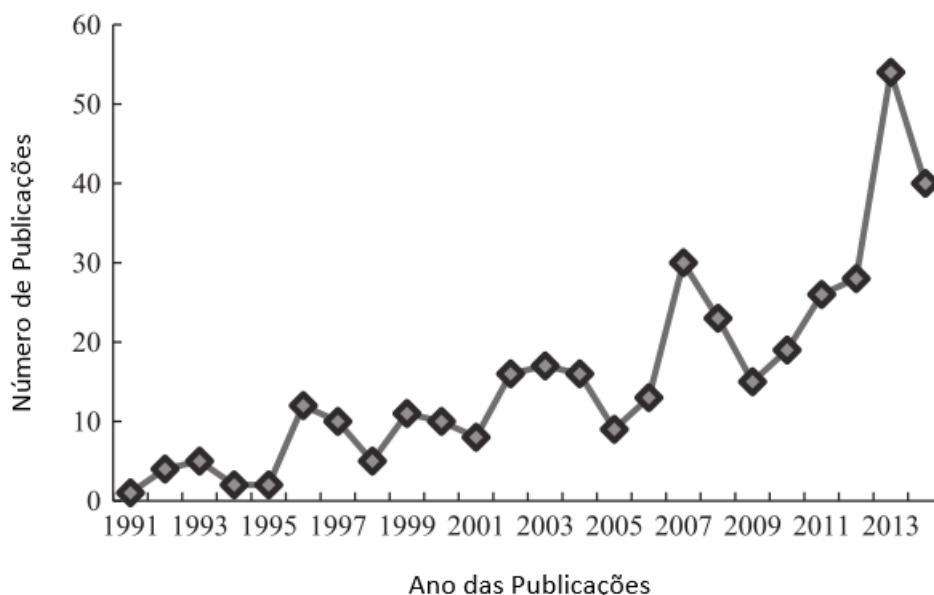


Figura 1: Número de publicações ao longo dos anos em revistas e jornais científicos. Pesquisa feita pelos autores utilizando a palavra-chave: "*Arcobacter*" tendo como base de dados o PubMed (Hsu and Lee 2015).

Apesar do crescente aumento no número de estudos relativos a este microrganismo, que vêm fundamentar a sua relevância como agente patogénico, existem ainda diversas lacunas no conhecimento relativo a *Arcobacter* spp..

1.1 Taxonomia do género *Arcobacter*

O género *Arcobacter* juntamente com os géneros *Campylobacter* e *Sulfurospirillum* formam a família *Campylobacteriaceae*, sendo esta considerada a maior e mais diversificada família da classe *Epsilonproteobacteria* não só devido à grande diversidade de ambientes dos quais têm sido isolados, mas também pela heterogeneidade filogenética existente entre os três géneros (Collado and Figueras 2011; Lastovica et al. 2014). *Arcobacter* foi isolado pela primeira vez a partir de fetos bovinos e suínos (Ellis et al. 1977; Ellis et al. 1978), tendo esses isolados sido classificados como *Campylobacter* aerotolerante, e denominado na altura por *Campylobacter cryaerophila* devido à proximidade fenotípica e genotípica a este género. Mais tarde uma nova espécie foi isolada a partir de raízes de *Spartina alterniflora* sendo nomeada por *Campylobacter nitrofigilis* (McClung, Patriquin and Davis 1983). O género *Arcobacter* foi proposto em 1991, e assim estas duas espécies foram reclassificadas como *Arcobacter cryaerophilus* e *Arcobacter nitrofigilis* (Vandamme et al. 1991). Até ao presente, 23 espécies foram já reconhecidas como pertencendo ao género *Arcobacter*, tendo estas sido isoladas a partir de diversas fontes como se pode observar na Tabela 1. Realçando-se, ainda, que nos últimos anos se verificou um aumento no reconhecimento de novas espécies de *Arcobacter*.

Tabela 1: Espécies de *Arcobacter* propostas e aceites por ano e origem do isolado. Adaptado de: (Hsu and Lee 2015; Whiteduck-Léveillé et al. 2015; Levican et al. 2015; Zhang et al. 2015; Whiteduck-Léveillé et al. 2016)

Estirpes	Ano	Origem do Isolado	Local	Referência
<i>A. cryaerophilus</i>	1977	Fetos Bovinos	Irlanda do Norte	(Ellis et al. 1978)
<i>A. nitrofigilis</i>	1983	Raízes de <i>Spartina alterniflora</i>	USA	(McClung, Patriquin and Davis 1983)
<i>A. butzleri</i>	1991	Amostras de fezes diarreicas	USA	(Kiehlbauch et al. 1991)
<i>A. skirrowii</i>	1992	Fluido prepucial de touros	Bélgica	(Vandamme et al. 1992)
<i>A. cibarius</i>	2005	Carcaças de frangos	Bélgica	(Houf et al. 2005)
<i>A. halophilus</i>	2005	Lagoa hipersalina	USA	(Donachie et al. 2005)
<i>A. mytili</i>	2009	Mexilhão e água salobra	Espanha	(Collado et al. 2009)
<i>A. thereius</i>	2009	Porcos e Patos	Bélgica	(Houf et al. 2009)
<i>A. marinus</i>	2011	Água do mar	Coreia	(Kim, Hwang and Cho 2010)
<i>A. trophiarum</i>	2011	Porcos de engorda	Bélgica	(Sarah De Smet et al. 2011)
<i>A. defluvii</i>	2011	Águas residuais	Espanha	(Collado et al. 2011)
<i>A. molluscorum</i>	2011	Mariscos	Espanha	(Figueras et al. 2011)
<i>A. ellisii</i>	2011	Mexilhões	Espanha	(Figueras et al. 2011)
<i>A. bivalviorum</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	Espanha	(Levican et al. 2012)
<i>A. venerupis</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	Espanha	(Levican et al. 2012)
<i>A. anaerophilus</i>	2013	Estuário	India	(Sasi Jyothsna et al. 2013)
<i>A. cloacae</i>	2013	Esgoto	Espanha	(Levican, Collado and Figueras 2013)
<i>A. suis</i>	2013	Porco	Espanha	(Levican, Collado and Figueras 2013)
<i>A. ebronensis</i>	2014	Mexilhões	Espanha	(Levican et al. 2015)
<i>A. aquimarinus</i>	2014	Água do mar	Espanha	(Levican et al. 2015)
<i>A. lanthieri</i>	2015	Porco e Estrume	Canadá	(Whiteduck-Léveillé et al. 2015)
<i>A. pacificus</i>	2015	Água do Mar	China	(Zhang et al. 2015)
<i>A. faecis</i>	2016	Águas residuais	Canadá	(Whiteduck-Léveillé et al. 2016)

A taxonomia de género *Arcobacter*, como a de outros géneros bacterianos, tem-se baseado na análise do gene *rRNA 16S* (Wesley et al. 1995) e pode ser observada na Figura 2.

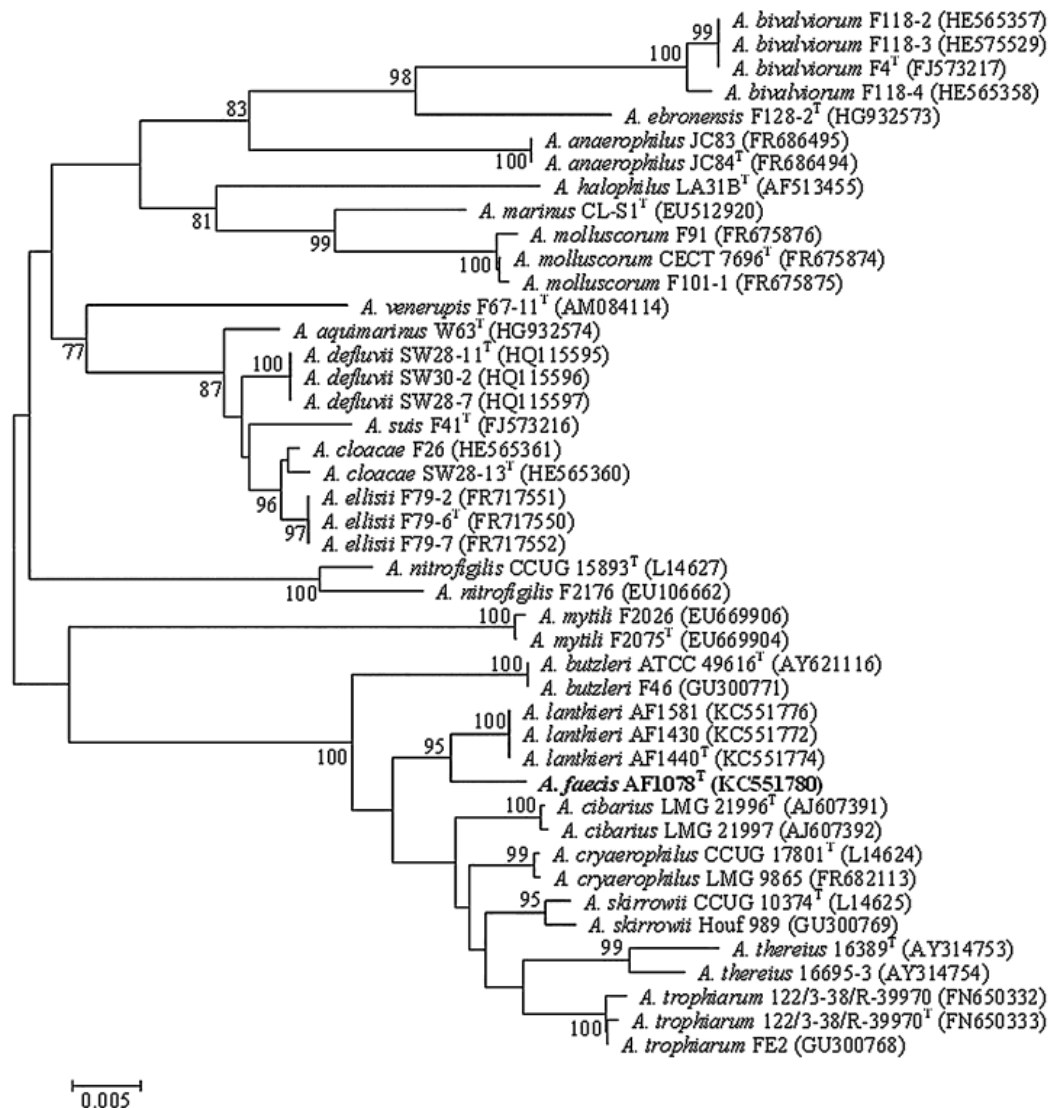


Figura 2: Árvore filogenética das diferentes espécies do género *Arcobacter*, tendo por base a similaridade da sequência do gene *rRNA 16S* (Whiteduck-Léveillé et al. 2016).

Os genes ribossomais *rRNA 16S* e *23S* têm sido largamente propostos como marcadores na deteção de *Arcobacter* spp. devido à sua abundância na célula, mas também por apresentarem uma estrutura em mosaico de regiões filogeneticamente conservadas e distintas adequada para a discriminação de um microrganismo específico ou um grupo bacteriano, tal como por apresentarem elevada disponibilidade de sequências em bases de dados (González et al. 2012). De facto, a partir de sequências depositadas em bases de dados públicas pode ainda inferir-se acerca da possível existência de novas espécies do género *Arcobacter* não reconhecidas até ao momento (Miller et al. 2007; Wesley and Miller 2010). No entanto, nos últimos anos, genes alternativos com níveis elevados de variabilidade da sequência têm surgido como possíveis genes candidatos para identificar e caracterizar diferentes espécies de *Arcobacter* (Abdelbaqi et al. 2010).

1.2 Características gerais do género *Arcobacter*

Dadas as semelhanças entre os géneros *Arcobacter* e *Campylobacter*, estes podem ser facilmente confundidos recorrendo apenas a métodos fenótipicos e bioquímicos (González et al. 2006; Yan et al. 2000), sendo, no entanto, algumas das espécies distinguidas por avaliação da aerotolerância e o crescimento a 15, 25 e 37 °C. Em geral, os testes bioquímicos usados rotineiramente para a identificação de bactérias clínicas costumam apresentar resultados variáveis para as espécies de *Arcobacter* (Tabela 2) (Debruyne, Gevers and Vandamme 2008), sendo assim recomendada a utilização de métodos moleculares para a sua identificação e caracterização (Levican, Figueras 2013).

As bactérias pertencentes ao género *Arcobacter* apresentam-se sob a forma de bacilo curvo podendo também apresentar-se numa forma de S ou helicoidal. Estas células apresentam um tamanho entre 0,2 a 0,9 µm de largura e 0,5 a 3 µm de comprimento. Todas as espécies apresentam motilidade através de um único flagelo polar, e são capazes de crescer sob condições de aerobiose ou microaerofilia, com a exceção de *A. anaerophilus*, recentemente descrito, que para além de não apresentar nenhum flagelo é ainda anaeróbio obrigatório. Já outras espécies que podem apresentar uma morfologia filamentosa, sendo assim distinta das restantes podendo chegar até aos 7 µm de comprimento como é o caso das espécies: *A. molluscorum*, *A. ellisii*, *A. suis* e *A. anaerophilus* (Ferreira et al. 2015).

De um modo geral, o género *Arcobacter* consegue crescer numa ampla gama de temperaturas (entre 15 a 42 °C) (Cervenka 2007). O crescimento de *A. butzleri* isolado de um doente com cirrose hepática foi observado a 42 °C (Yan et al. 2000), enquanto outros estudos remetem para a ausência de crescimento a 40 °C, tendo-se mesmo verificado uma diminuição do crescimento bacteriano a 37 °C, com no entanto, uma taxa de crescimento elevada a 30 °C (Hilton et al. 2001). Nesse mesmo estudo foi demonstrado que a temperatura mais baixa à qual existiu crescimento foi 15 °C (Hilton et al. 2001), noutro trabalho foi observado crescimento a temperaturas mais baixas nomeadamente a 10 °C em meio *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH) (D'Sa and Harrison 2005). Assim, verifica-se uma influência da temperatura no crescimento com dependência das condições de crescimento, mas também das estirpes em estudo (Tabela 2). No que diz respeito ao pH, é sabido que o género *Arcobacter* consegue crescer num intervalo de 5,5 a 8,0, sendo que o crescimento ótimo ocorre entre os 6,0 e os 7,5 dependendo das espécies e estirpes. Algumas espécies conseguem também tolerar um pH de 5 especialmente quando sujeitas a condições consideradas inadequadas de temperatura (25 °C) durante 2 dias (Cervenka 2007).

Tabela 2: Características fenotípicas das 23 espécies reconhecidas de *Arcobacter* spp. Adaptado de (Ferreira, Oleastro and Domingues 2016)

Características	<i>A. nitrofigilis</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. cibarius</i>	<i>A. halophilus</i>	<i>A. mytili</i>	<i>A. thereius</i>	<i>A. marinus</i>	<i>A. trophiarum</i>	<i>A. defluvii</i>	<i>A. molluscorum</i>	<i>A. ellisii</i>	<i>A. bivalviorum</i>	<i>A. venerupis</i>	<i>A. cloacae</i>	<i>A. suis</i>	<i>A. anaerophilus</i> ¹	<i>A. ebronensis</i>	<i>A. aquamarinus</i>	<i>A. lanthieri</i>	<i>A. pacificus</i>	<i>A. faecis</i>
Crescimento em																							
<i>Aerobiose a 37 °C</i>	V(-)	V(+)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Microaerofilia a 37 °C</i>	-	V(+)	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>MacConkey Agar</i>	-	V(-)	+	-	V	-	+	V(+)	-	V(+)	+	+	V(+)	-	+	+	+	ND	-	-	+	-	+
<i>Minimal medium</i>	-	V(-)	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	V	+	ND	+	-	ND	-	-
<i>NaCl (4 %)</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	V(-)	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>Glicina (1 %)</i>	-	V(-)	V(-)	V(-)	-	+	+	+	+	V(-)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	ND	-
Resistência à cefoperazona (64 mg/L)	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	V(+)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Actividade enzimática																							
<i>Catalase</i>	+	+	(+)	+	V	-	+	+	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Urease</i>	V(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	V(-)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Redução de nitratos</i>	+	V	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Hidrólise do acetato de indoxil</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Produção de H₂S</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	-	-

+, ≥95 % das estirpes positivas; (+), positivo fraco; -, ≤10 % das estirpes positivas; V, Variável; V (+), Variável onde a maioria das estirpes foram positivas; V(-), Variável onde a maioria das estirpes foram negativas; ND, Não Determinado. Todas as estirpes foram Gram negativas e oxidase positiva, com a exceção de *A. pacificus*, que foi oxidase negativa.¹ Anaeróbico obrigatório não cresce em agar de sangue.

1.3 Importância clínica e veterinária do género *Arcobacter*

Diferentes espécies do género *Arcobacter* têm sido isoladas a partir de várias origens, tais como animais e seus derivados como é o caso do leite, amostras clínicas humanas, água doce e marinha, mariscos e outros alimentos, sobretudo de origem animal (Atabay and Corry 1998; Collado and Figueras 2011; de Boer et al. 1996; De Oliveira et al. 2003; Kiehlbauch et al. 1991; Lau et al. 2002; Ridsdale, Yan et al. 2000). De todas as espécies identificadas, três têm sido mais frequentemente associadas a humanos e animais doentes (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*), no entanto foram também já isoladas a partir de indivíduos saudáveis (Collado and Figueras 2011).

Epidemiologicamente, *A. butzleri* é a espécie que se tem demonstrado como mais relevante dentro do seu género, tendo sido classificada como um perigo severo para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF). Nessa mesma lista encontra-se também a espécie *A. cryaerophilus* (ICMSF 2002). Além disso, foram identificados genes putativos de virulência em isolados das espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* provenientes de amostras ambientais e alimentos de origem animal, genes esses que estão associados aos processos de adesão, invasão e citotoxicidade celular (Tabatabaei et al. 2014). A presença desses genes putativos de virulência foi ainda descrita em outras espécies como *A. cibarius*, *A. nitrofigilis*, *A. trophiarum*, *A. defluvii*, *A. molluscorum*, *A. ellisii*, *A. bivalviorum*, *A. venerupis*, *A. suis* e *A. cloacae* isoladas a partir de diversas fontes (Levican et al. 2013). A identificação destes genes é um fator indicativo da patogenicidade desta bactéria, dado que estes apresentam homologia com determinantes de virulência descritos para outros organismos. No entanto, até ao momento não foi ainda possível estabelecer uma relação clara entre a presença destes genes e as características de virulência em *Arcobacter* (Ferreira et al. 2015).

1.3.1 Humanos

A epidemiologia do género *Arcobacter* ainda não é bem conhecida, no entanto, vários têm sido os estudos de isolamento e deteção a partir de amostras humanas (Collado and Figueras 2011). Duas das espécies deste género, *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*, têm sido associadas a doenças gastrointestinais em diversos estudos (Jiang et al. 2010; Kopilović et al. 2008; Samie et al. 2007; Vandenberg et al. 2004). Nesses casos, o principal sintoma geralmente apresentado é uma diarreia aquosa e persistente, contrariamente ao que é observado numa infeção por *Campylobacter jejuni* em que as fezes diarreicas se apresentam como sanguinolentas (Vandenberg et al. 2004). Diversos têm sido os estudos que associam *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* a enterites e ocasionalmente a bacteremias, enquanto *A. skirrowii* é normalmente associado a fezes diarreicas (Ferreira et al. 2015).

Em diferentes estudos já realizados, *A. butzleri* foi considerado o quarto organismo relacionado com *Campylobacter* mais prevalente em amostras diarreicas humanas em diversos Países (Ferreira et al. 2015), nomeadamente em Portugal. Neste estudo, foram analisadas 298 amostras de fezes diarreicas humanas, onde 1,7% das amostras foram positivas para *Arcobacter* spp. (Ferreira et al. 2014). Num estudo alargado com 8994 amostras, realizado na Bélgica, as espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* foram encontradas em amostras fecais de indivíduos com sintomas de enterite com uma prevalência de 0,7 e 0,6 % respetivamente. Nesse mesmo estudo, *A. thereius* foi pela primeira vez isolado a partir de amostras humanas em pacientes com enterocolite, tendo este sido o único agente patogénico bacteriano encontrado (Van den Abeele et al. 2014). A mais elevada frequência de deteção de *A. butzleri* (8%) foi encontrada em amostras recolhidas de viajantes que apresentaram diarreia após viajarem para países como o México, Guatemala e Índia, no entanto, outros microrganismos foram co-isolados não podendo assim esta bactéria apontada como o agente causal de doença (Jiang et al. 2010). Apesar dos diversos estudos que têm vindo a associar *Arcobacter* spp. a doenças gastrointestinais, *A. cryaerophilus* foi também encontrado em amostras de indivíduos saudáveis, sendo que isolado a partir de 1,4% das amostras de fezes de pessoas assintomáticas que trabalhavam em matadouros na Suíça (Houf and Stephan 2007).

Até ao momento, ainda não está claramente estabelecido, se fatores como a idade e o estado do sistema imunológico ou mesmo outras patologias podem ter uma associação a infeções por *Arcobacter*. Num estudo realizado na Índia obteve-se uma percentagem de isolados de origem fecal mais elevado em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (VIH) do que isentos do mesmo (1,5% e 1% respetivamente), no entanto, sem associação estatística (Kownhar et al. 2007). Também, um trabalho desenvolvido em África do Sul não conseguiu estabelecer uma relação direta entre a presença deste organismo e a infeção por VIH (Samie et al. 2007). Por sua vez, num estudo comparativo entre pessoas saudáveis e pessoas com diabetes verificou-se um número elevado de amostras positivas para *Arcobacter* nas pessoas portadoras de diabetes quando comparadas com as ditas saudáveis (Fera et al. 2010). Esta bactéria tem ainda sido co-detetada com *Campylobacter* spp., no entanto, serão necessários mais estudos até ser possível estabelecer relações diretas entre a presença de *Arcobacter* spp. e outras co-morbididades (Collado et al. 2013; Ferreira et al. 2014; Samie et al. 2007).

Relativamente aos relatos de bacteriemias, as espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* têm sido associadas a estes casos (Hsueh et al. 1997; Lau et al. 2002; On, Stacey and Smyth 1995; Yan et al. 2000). Num desses casos *A. butzleri* foi isolado a partir de sangue de um recém-nascido, tendo sido apontado como um fator indicativo de uma possível transmissão transplacentária entre mãe e filho (On, Stacey and Smyth 1995).

Diversos casos de doença em humanos associada a infeção por espécies de *Arcobacter* têm sido referidos na literatura, nomeadamente requerendo hospitalização dos indivíduos infetados, como é o exemplo de um surto numa creche e escola primárias em Itália no qual se observou que as infeções provocadas por *A. butzleri* levaram a hospitalização (Vandamme et al. 1992).

No entanto, há vários fatores que dificultam o estabelecimento da real frequência da infecção humana por *Arcobacter* spp.: o facto de os sintomas associados a uma infecção causada por *Arcobacter* spp. serem semelhantes aos apresentados numa infecção por *Campylobacter*, podem assim ocultar o seu papel; de na prática clínica as amostras biológicas não serem rotineiramente testadas para *Arcobacter* spp. como acontece para *Salmonella* spp. ou *Campylobacter* spp. (Lehner, Tasara and Stephan 2005); e também de esta ser uma infecção que pode ser autolimitada e a sua sintomatologia pode ser moderada fazendo com que as pessoas não se desloquem ao hospital (Ferreira et al. 2015).

1.3.2 Animais

O género *Arcobacter* tem sido frequentemente isolado a partir do trato intestinal e de amostras fecais de diferentes animais de exploração agrícola, no entanto aparenta ter capacidade de causar doença em apenas alguns deles (Ho, Lipman, and Gaastra 2006). Os efeitos mais graves associados à infecção por *Arcobacter* em animais inclui abortos, mastites e diarreia (Logan, Neill and Mackie 1982; Vandamme et al. 1992).

A espécie *A. cryaerophilus* é a que mais tem sido associada com o aborto em animais, enquanto o isolamento de *A. butzleri* e *A. skirrowii* é menos frequente (de Oliveira et al. 1997; ; On, Harrington and Atabay 2003; Schroeder-Tucker et al. 1996). *A. butzleri* tem sido associado com diarreia e enterite em suínos, gado e cavalos, enquanto *A. skirrowii* tem sido associado com diarreia e colite hemorrágica em ovinos e bovinos (Ho, Lipman, and Gaastra 2006; Vandamme et al. 1992). A maioria dos casos reportados que afetam os animais restringem-se a aves e mamíferos, embora um estudo tenha relatado o isolamento de *A. cryaerophilus* a partir de uma truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*). A patogenicidade da estirpe recuperada foi demonstrada através de infecção experimental *in vivo* levando a danos no fígado, rins e intestinos acabando por causar a morte do peixe (Yildiz and Aydin 2006). Relativamente às aves, apesar de a contínua libertação fecal de *Arcobacter* por estas (frango, pato, peru e ganso) ser bem conhecida, não existem relatos associados a doenças nestes animais, podendo isso indicar que as aves são um reservatório natural para as espécies destas bactérias (Atabay et al. 2008; Lipman, Ho and Gaastra 2008). Os porcos foram também considerados hospedeiros importantes e possíveis reservatórios das espécies de *Arcobacter* (Ho et al. 2006).

Também os animais domésticos como gatos ou cães têm sido descritos como possíveis portadores de *Arcobacter* spp., tendo *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* sido detetados a partir de fezes ou esfregaços orais recolhidos a partir destes animais (Fera et al. 2009; Houf et al. 2008).

Poucos estudos foram realizados para determinar a presença de diferentes espécies de *Arcobacter* em animais, como foi indicado por Hamit et al. (2004). Nesse mesmo estudo foi reportada a presença de *Arcobacter* spp. em 6/10 amostras intestinais de guaxinis, e foi mesmo sugerido que os guaxinis, o rinoceronte branco e a gazela poderiam desempenhar um papel

importante na epidemiologia desta bactéria, uma vez que partilham o ambiente urbano e suburbano com os humanos (Hamir et al. 2004). Outros animais exóticos ou não domesticados foram também já indicados devido à presença de *Arcobacter* tais como a tartaruga de Galápagos, a ema e a alpaca (Wesley 2010).

Assim, para além do potencial patogénico que *Arcobacter* pode ter em animais de consumo, domésticos ou outros, estes podem também ser um veículo de transmissão desta bactéria a humanos.

1.4 Vias de transmissão

Embora ainda não tenha sido estabelecida uma relação direta entre o consumo de alimentos ou água contaminada por *Arcobacter* e o aparecimento de uma doença humana, esta tem sido a via de transmissão descrita como a mais provável (Collado and Figueras 2011). De fato, a sua presença em alimentos e águas, e a implicação de *Arcobacter* spp. em alguns surtos onde ocorreu isolamento desta bactéria quer nos indivíduos quer naquela que se supõe ser a fonte de contaminação vem apoiar esta hipótese (Fong et al. 2007; Kopilović et al. 2008; Rice et al. 1999). No entanto, outras vias de transmissão têm sido apontadas como possíveis, tais como o contacto com diversos animais, uma possível transmissão de pessoa para pessoa, quer entre animais (Collado and Figueras 2011). Para além disso, diferentes espécies de *Arcobacter* têm vindo a ser consideradas potenciais agentes zoonóticos devido à potencial infeção humana quando alimentos de origem animal contaminados são consumidos (Ho, Lipman and Gaastra 2006).

1.4.1 Consumo de água contaminada

Diferentes autores têm vindo a sugerir que o consumo de água contaminada pode ser uma via de transmissão de *Arcobacter* spp. para humanos e animais (Ho, Lipman and Gaastra 2006). Essa ideia foi reforçada inicialmente por um estudo no qual se isolaram estirpes de *A. butzleri* a partir de água de estações de tratamento de águas na Alemanha, as quais apresentavam serotipos descritos em isolados humanos (Jacob, Woodward and Feuerpfeil 1998). O género *Arcobacter* foi também associado a surtos relacionados com o consumo de águas (Rice et al. 1999; Fong et al. 2007; Kopilović et al. 2008). O primeiro descrito por Rice et al. (1999) num acampamento feminino de escuteiros em Idaho, onde os indivíduos com gastroenterite apresentavam como principais sintomas: náuseas, vômitos, cólicas e diarreia. *A. butzleri* foi isolado a partir da água de um poço usado para consumo, sendo que naquele período o sistema de cloração do acampamento não estava nas devidas condições, impedindo assim o tratamento adequado da água, e sendo assumido que esta seria a fonte de contaminação responsável por este surto (Rice et al. 1999). O segundo surto foi reportado em Ohio, tendo sido relatados 1450 casos de indivíduos com cólicas e diarreia como principais sintomas, e isolados diferentes microrganismos a partir de amostras de água (Fong et al. 2007). O terceiro caso remete-se ao

isolamento de *A. cryaerophilus* e outros patogénicos, a partir de amostras de fezes de pacientes na Eslovénia durante um surto causado por contaminação do sistema de água potável, após este ter entrado em contato com o sistema de esgotos, no entanto sem se ter conseguido estabelecer uma relação etiológica com o agente (Kopilović et al. 2008). Apesar de a água se apresentar como uma possível fonte de contaminação, o tratamento adequado das águas demonstrou que pode ser eficaz na remoção das diferentes espécies de *Arcobacter*. Em 2010 foi analisada a água do rio Llobregat em Barcelona, uma das maiores estações de tratamento de águas para consumo humano daquela região, onde as espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* se encontravam de modo predominante. No entanto, apesar de encontradas em vários pontos da estação de tratamento de águas, espécies de *Arcobacter* não foram isoladas nem detetadas na água para consumo humano (Collado et al. 2010).

1.4.2 Consumo de alimentos contaminados

Os produtos alimentares de origem animal também têm sido sugeridos como uma potencial fonte de contaminação de *Arcobacter* spp. (Ho, Lipman and Gaastra 2006). Esta hipótese baseia-se na alta prevalência destes microrganismos no trato intestinal, amostras de fezes de animais de quinta saudáveis e em vários produtos de carne vendidos a retalho (Ferreira, Oleastro and Domingues 2016; Van Driessche et al. 2003). Supõe-se que a contaminação de produtos de carne por *Arcobacter* spp. ocorre provavelmente quando as fezes dos animais infetados entram em contacto com as carcaças durante o processo de abate (Van Driessche and Houf 2007). Também o consumo de marisco foi apontado como uma possível fonte de contaminação (Maugeri et al. 2000), pois foi encontrado neste alimento uma grande prevalência e elevada diversidade de espécies de *Arcobacter* (Collado, Guarro and Figueras 2009). Este tipo de alimento pode ter uma grande relevância para a transmissão desta bactéria dado que o marisco é por vezes consumido cru ou mal cozinhado (Collado and Figueras 2011). Dados de prevalência de *Arcobacter* spp. em alimentos prontos a consumir estão igualmente descritos, sugerindo-se que o consumo dos mesmos ser também uma via de transmissão para os Humanos (Mottola et al. 2016).

1.4.3 Transmissão pessoa-pessoa

A transmissão de *A. butzleri* de pessoa para pessoa foi inicialmente sugerida em um surto de cólicas recorrentes numa escola em Itália (Vandamme et al. 1992). A análise dos dados epidemiológicos das amostras dos diferentes pacientes infetados mostrou que todas as estirpes recuperadas partilhavam o mesmo fenótipo e genótipo (Vandamme et al. 1992; Vandamme et al. 1993). Outro caso de estudo apresentando uma possível transmissão pessoa-pessoa, refere-se a uma possível transmissão entre mãe e filho *in utero*, em que após o nascimento, o recém-nascido se apresentava com bacteriemia. Como lhe foi isolada uma estirpe de *A. butzleri* pode indicar assim uma possível transmissão vertical da mãe para o feto (On, Stacey and Smyth 1995).

1.4.4 Contacto com animais domésticos e selvagens

O contacto com as fezes de animais domésticos ou o facto de se permitir ser lambido por eles retrata uma outra possível via de transmissão de *Arcobacter* spp., uma vez que diversos estudos têm reportado a presença destas bactérias tanto na boca como em fezes animais (Collado and Figueras 2011). Em 2009 foi reportada uma elevada prevalência de *A. butzleri* (77,6 %) e *A. cryaerophilus* (34,1 %) em esfregaços orais de gatos domésticos (Fera et al. 2009). Nesse mesmo estudo foi também sugerido que a presença de *Arcobacter* spp. nesses animais de estimação pode desempenhar um papel na sua disseminação no habitat doméstico. No entanto, um estudo anterior realizado na Bélgica não tinha sido relatado o isolamento a partir de esfregaços orais ou de fezes de gatos domésticos, apresentando ainda com uma baixa frequência de *A. cryaerophilus* em fezes (1,5 %) e esfregaços orais (0,7 %) de cães domésticos, e de *A. butzleri* em amostras fecais (0,75 %) (Houf et al. 2008). No Chile foi reportada uma prevalência de *Arcobacter* spp. de 3,3 % em fezes de cães (Fernandez, Vera and Villanueva 2007), e em estudo similar na Turquia não se obteve nenhuma amostra positiva a partir do mesmo tipo de amostras (Aydin et al. 2007). Apesar da discrepância de valores, estes estudos sugerem que o contacto com animais portadores de *Arcobacter* spp. pode ser também uma via de transmissão para os humanos.

1.4.5 Transmissão animal-animal

A presença de genótipos comuns entre animais tem apontado para a possibilidade de transmissão de *Arcobacter* spp. entre animais (Ho, Lipman and Gaastra 2008). Ho et al. (2008) descreveu uma grande prevalência de *Arcobacter* spp. no conteúdo intestinal de aves, nos quais os isolados recuperados dos intestinos e das carcaças do mesmo bando de aves partilhavam genótipos semelhantes, esta similaridade de genótipos entre diferentes animais pode significar assim uma transferência direta destas bactérias (Ho, Lipman and Gaastra 2008). Também foi relatada a transmissão vertical ou transplacentária de *Arcobacter* spp. a partir de suínas adultas prenhas para os seus descendentes, tal como a transmissão pós-natal para os leitões a partir das suas progenitoras, dos recém-nascidos ou do ambiente (Ho et al. 2006) demonstrando-se assim a possibilidade de uma transmissão entre progenitores e descendentes.

1.5 Distribuição de *Arcobacter* spp.

O género *Arcobacter* tem sido isolado a partir de uma grande diversidade de origens, tais como alimentos, água e vida selvagem (Collado and Figueras 2011). Apesar de até ao momento ter sido dada uma maior relevância à avaliação da sua distribuição no sector alimentar, devido ao seu papel como agente patogénico de origem alimentar, existem ainda diversos países acerca dos quais não existem dados. A Figura 3 retrata a distribuição global de *Arcobacter* em 16 Países distintos nos quais foi identificada a existência desta bactéria em diferentes categorias alimentares. Os países a vermelho indicam que foi encontrado *Arcobacter* spp. em alimentos

incluindo alimentos de origem animal e ambientes de processamento alimentar, os países a azul referem-se a amostras de água e os de cor roxa indicam a presença de *Arcobacter* spp. nas duas categorias (Hsu and Lee 2015). Os autores não referem dados relativos às zonas apresentadas a cinza, no entanto em Portugal a presença de *A. butzleri* foi já relatada em ambiente de matadouro de aves de capoeira não só nos bandos analisados como também nas superfícies do estabelecimento (Ferreira et al. 2013). Quando comparados os vários estudos que se encontram referenciados nesta revisão global, chega-se à conclusão que relativamente à prevalência das diferentes espécies, a nível global, a mais comumente encontrada é *A. butzleri*, seguida por *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (Hsu and Lee 2015).

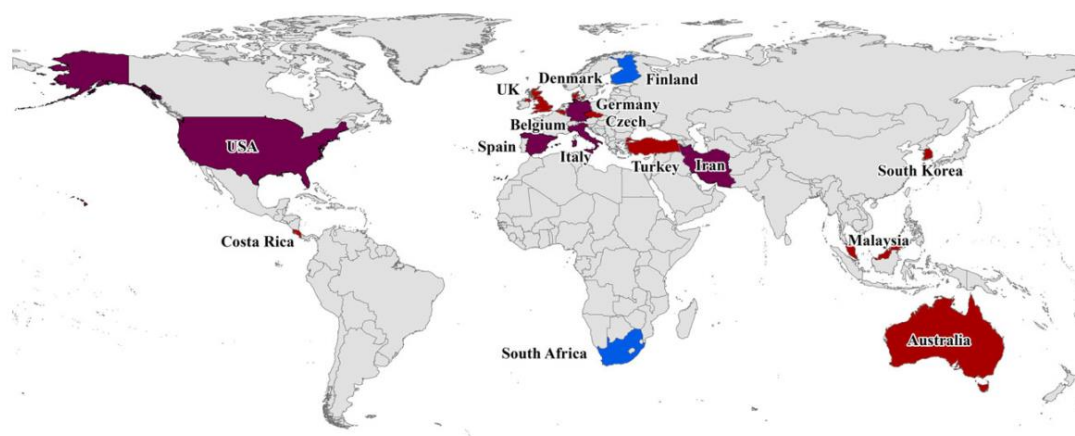


Figura 3: Representação gráfica da distribuição global de *Arcobacter* em alimentos e águas (Hsu and Lee 2015)

1.5.1 *Arcobacter* em alimentos de origem animal

A prevalência de *Arcobacter* tem sido demonstrada em diferentes animais de consumo, incluindo amostras como frango, peru, gado bovino e ovino em diversos países como Austrália, Costa Rica, República Checa, Itália, Malásia, Espanha, Inglaterra e Estados Unidos da América. De maneira geral, concluiu-se que a prevalência média de *Arcobacter* em amostras animais se encontra distribuída da seguinte maneira: gado bovino (54,3 %) > aves de capoeira (35,9 %) > ovelhas (13,7 %) (Hsu and Lee 2015). O frango foi considerado um dos principais reservatórios de *Arcobacter* spp. com uma incidência de contaminação entre 0,017 % e 55,1 %, enquanto no gado a prevalência foi entre 6,2% e 96,7% (Hsu and Lee 2015). Quando considerada a prevalência de *Arcobacter* spp. em produtos animais de comércio a retalho a distribuição varia (Ferreira, Oleastro and Domingues 2016).

Diversos fatores podem estar associados a diferentes prevalências, sendo mesmo que pode haver adaptação específica de uma mesma espécie a hospedeiros específicos. Comparações genômicas efetuadas entre isolados de *A. butzleri* obtidos a partir de humanos e de vacas leiteiras saudáveis demonstraram a possibilidade desta adaptação (Merga et al. 2013). Quando comparada a prevalência de *Arcobacter* spp. em animais sujeitos a diferentes condições de criação em Inglaterra, verificou-se uma maior prevalência de *Arcobacter* em gado bovino mantido preso, do que no gado que tinha a possibilidade de pastar, com uma prevalência de 50,1 % e 20,9 % respetivamente. Esta discrepância foi descrita como podendo estar associada à diferente constituição da alimentação dada às duas categorias, salientando o papel das práticas agrícolas utilizadas nas diferenças de prevalência de *Arcobacter* spp. em diversos animais (Grove-White et al. 2014; Hsu and Lee 2015). Esta descoberta pode assim vir a criar alternativas viáveis para o controlo dos níveis de *Arcobacter* desde o início da criação até ao abate, de maneira a evitar a contaminação da carne durante todas as etapas desse processo. No entanto, serão necessárias mais pesquisas para uma melhor compreensão da relação entre as práticas agrícolas, e os níveis de agentes patogénicos em cada uma das etapas (Hsu and Lee 2015).

1.5.2 *Arcobacter* em alimentos de comércio a retalho e ambientes de processamento alimentar

Quando se trata de alimentos de consumo diário e venda em comércio a retalho a prevalência de *Arcobacter* spp. diverge. Assim de um modo global, a carne de aves de capoeira é o tipo de carne na qual tem sido reportada as maiores prevalências de *Arcobacter* spp. com prevalências entre 3,3 e 100 %, seguindo-se a carne de porco alcançando 52,9 % de amostras positivas e por fim a carne de vaca para a qual foi já reportada uma prevalência de 37 % das amostras contaminadas por espécies do género *Arcobacter*. No que respeita a amostras de marisco variado, elevados valores de prevalência foram também descritos encontrando-se estas entre 34 e 73,3 % (Ferreira, Oleastro and Domingues 2016). Relativamente a amostras de vegetais, *Arcobacter* spp. foi já detetado em espinafres (Hausdorf et al. 2013) e alfaces frescas (González and Ferrús 2011).

Diversos estudos têm demonstrado a presença de *Arcobacter* spp. logo nas instalações de processamento de alimentos, tendo-se verificado uma maior prevalência em ambientes de processamento de laticínios com 40,0 % seguindo-se a manipulação de vegetais com 29,4 %, processamento de aves com 13,6 % e por fim de carne bovina com 6,2 % (Hsu and Lee 2015). Num estudo realizado em Portugal a prevalência de *A. butzleri* foi mesmo de 100% nas superfícies analisadas de um matadouro de aves (Ferreira et al. 2013). Relativamente a ambientes de processamento alimentar *Arcobacter* spp. tem sido detetado ao longo de toda a linha de processamento, incluindo superfícies em contacto ou sem contacto com alimentos (Giacometti et al. 2013), e mesmo após desinfeção (Serraino and Giacometti 2014). Sendo que

no caso de vegetais este microrganismo foi detetado mesmo após lavagem e desinfecção dos espinafres (Hausdorf et al. 2013).

Os relatos relativos à distribuição de *Arcobacter* em ambiente de processamento alimentar têm demonstrado não só a possibilidade de persistência desta bactéria no ambiente (Hausdorf et al. 2013; Serraino and Giacometti 2014), mas também a possibilidade de contaminação cruzada durante o processamento alimentar (Ferreira et al. 2013; Giacometti et al. 2014). Assim, tem vindo a ser sugerida a necessidade de aplicação de práticas de higiene adequadas à redução ou mesmo erradicação da transmissão de *Arcobacter* dos ambientes de processamento alimentar para os próprios alimentos destinados ao consumo humano (Hsu and Lee 2015).

1.6 Isolamento e identificação de *Arcobacter* spp.

1.6.1 Isolamento

A partir do momento em que se isolou e conseguiu identificar isolados como pertencentes ao género *Arcobacter*, vários estudos têm sido feitos de maneira a tentar estabelecer um protocolo de isolamento ideal para este género. Em 1996, Boer e seus colaboradores desenvolveram e testaram dois meios seletivos distintos (um líquido para enriquecimento da amostra e um sólido para isolamento) suplementados com piperacilina (75 mg/L), cefoperazona (32 mg/L), trimetoprim (20 mg/L), cicloheximida (100 mg/L), verificando que o isolamento de culturas puras era possível, embora o meio sólido permitisse o desenvolvimento de microflora acompanhante com capacidade de *swarming* (de Boer et al. 1996). Foi mais tarde proposto por Atabay e Corry (1997) a utilização de um meio de enriquecimento suplementado com três antibióticos distintos: cefoperazona (8 mg/L), anfotericina B (10 mg/L) e teicoplanina (4 mg/L) (CAT), sendo as amostras após uma etapa de enriquecimento transferidas para meio agarizado suplementado também com CAT para o isolamento. Nesse estudo, foi paralelamente avaliado o isolamento das amostras em agar de sangue recorrendo ao método da filtração passiva, tendo ambos os protocolos permitido o isolamento de *Arcobacter* spp. (Atabay, Corry and On 1997). Em 1999 foi proposta uma nova formulação constituída por sais biliares, cefoperazona (32 mg/L) e 5-fluorouracil (200 mg/L) com uma boa capacidade de isolamento, e superior inibição do crescimento de outros microrganismos nas placas (Johnson and Murano 1999). Dois anos depois, após um estudo de resistência a antibióticos de *Arcobacter* spp., Houf et al. (2001) propuseram um método de isolamento seletivo por adição de cinco antibióticos distintos ao meio de enriquecimento com concentrações ajustadas, e ao meio agarizado onde as estirpes seriam cultivadas, demonstrando também uma alta inibição do crescimento de microflora acompanhante (Houf et al. 2001b). Nesse mesmo estudo foi verificada uma discrepância na percentagem de isolamento de *Arcobacter* spp. quando comparada a utilização de um passo de enriquecimento, ou isolamento direto, obtendo-se percentagens de isolados positivos de 73% e 50%, respetivamente, indicando assim que a utilização de um enriquecimento leva a taxas de

recuperação de *Arcobacter* spp. superiores (Houf et al. 2001b). Por outro lado, a utilização de um passo de enriquecimento é por vezes apontado como diminuindo a diversidade de espécies isoladas quando comparadas com o isolamento direto (Houf et al. 2002). No entanto, a aplicação do método proposto por Atabay e Corry (1997) com pequenas modificações, tem sido apoiada por diversos estudos quando considerado o número de espécies possíveis de isolar (Collado et al. 2011), nomeadamente por um estudo realizado em amostras de crustáceos em que foram isoladas e identificadas onze espécies distintas de *Arcobacter* (Levican et al. 2014). Diversos parâmetros podem ter influência no isolamento de *Arcobacter* spp. nomeadamente o tempo de incubação ou as condições atmosféricas de incubação. Relativamente ao tempo de incubação, colónias de *A. butzleri* podem ser visíveis após 24 h de incubação com uma etapa de enriquecimento prévio, no entanto espécies como *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* podem necessitar de 48 ou até 72 h de incubação para se tornarem visíveis (Houf et al. 2001b). Também o tempo de incubação relativo ao passo de enriquecimento foi apresentando como tendo relevância para a recuperação de *Arcobacter* spp., sendo que esta pode aumentar com períodos superiores de enriquecimento (Collado and Figueras 2011). No que diz respeito às condições atmosféricas, nomeadamente, se as incubações são feitas sob condições de aerobiose ou microaerobiose, a comparação entre as duas condições foi efetuada por Gonzalez et al. (2007). No entanto, os resultados foram inconclusivos não se tendo observado uma discrepância evidente entre as duas condições, apesar da ligeira melhoria da taxa de isolamento em condições de microaerofilia (González et al. 2007). Por outro lado, o estudo de Levican et al. (2014) revelou um maior número de isolados obtidos sob condições de aerobiose comparativamente com a incubação em microaerobiose, sendo que as condições atmosféricas de incubação influenciaram também a diversidade de espécies (Levican et al. 2014). Assim, os autores sugerem que a utilização simultânea das duas condições atmosféricas para além de contribuir para o número de amostras positivas vai também ter um papel no aumento da diversidade genética, relativa ao número de espécies mas também de genótipos. No entanto, os autores sugerem a incubação aeróbia como prática rotineira para a cultura e isolamento de *Arcobacter* spp. (Levican et al. 2014).

Apesar dos vários esforços e protocolos que têm vindo a ser propostos para o isolamento de *Arcobacter* spp., não existe ainda uma padronização reconhecida da metodologia. A ocorrência de sobreposição de crescimento da flora acompanhante, nomeadamente na forma de *swarming* é também um ponto a ter em conta, pois pode inviabilizar todo o processo de isolamento (Mansfield and Forsythe 2000), no entanto o reforço da seletividade dos meios por aumento dos antibióticos pode afetar a recuperação e taxas de isolamento (Fera et al. 2004). Assim, novos estudos devem ser realizados de maneira a tentar estabelecer um protocolo padrão para o isolamento de *Arcobacter* spp..

1.6.2 Detecção e identificação de *Arcobacter* spp. baseada em métodos moleculares

O uso exclusivo de métodos convencionais e bioquímicos para a detecção e identificação de *Arcobacter* spp. pode resultar numa identificação ambígua e/ou falsa destas bactérias, podendo as semelhanças entre a morfologia e as características bioquímicas das espécies de *Arcobacter* e *Campylobacter* convergir numa identificação incorreta dos isolados (González et al. 2012). Assim, a detecção e identificação de *Arcobacter* spp. tem-se baseado em abordagens moleculares, para a qual diversos métodos têm sido desenvolvidos com este objetivo.

A utilização de métodos moleculares na detecção e identificação de agentes patogénicos de origem alimentar tornou-se uma alternativa válida aos testes microbiológicos convencionais, conseguindo assim alcançar resultados e dissipar algumas dúvidas provenientes do método de cultura escolhido e identificação bacteriológica fenotípica (Rantsiou, Lamberti and Cocolin 2010).

Os métodos baseados ácidos nucleicos têm sido amplamente utilizados e considerados como a melhor opção para a identificação e diferenciação de espécies de *Arcobacter*, mostrando claras vantagens quando utilizados, visto que o DNA bacteriano não depende das condições de crescimento, e alberga em si regiões com diferentes graus de variabilidade que podem ser usadas como sequências alvo específicas de um determinado género ou espécie, ou mesmo diferenciar estirpes pertencentes à mesma espécie (González et al. 2012).

Entre as diferentes técnicas moleculares, as que têm sido mais utilizadas são as que se baseiam na amplificação do DNA através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) devido à sua sensibilidade, especificidade e rapidez, e conseguindo assim detetar, caracterizar e identificar uma grande variedade de organismos (Hanna, Christopher and Connor 2005). No entanto, diversos parâmetros como o meio de enriquecimento usado, o tempo de incubação e a origem da amostra podem afetar o processo, e impedir assim a detecção do género e/ou espécies de interesse (Pejchalová et al. 2006). Assim, diversas técnicas baseadas em PCR têm vindo a ser propostas para a identificação e distinção de *Arcobacter* spp., onde de maneira a conseguir identificar o género e distinguir as espécies são desenhados oligonucleótidos específicos, permitindo assim a amplificação do material genético característico tendo como alvo principalmente os genes *16S* e *23S rRNA* funcionando assim como marcadores na identificação e distinção das diferentes espécies deste género (González et al. 2012).

O primeiro PCR específico para detetar o género *Arcobacter* foi proposto por Harmon and Wesley em 1996, sendo os isolados identificados através da amplificação de um fragmento do rRNA 16S com 1,223 pares de bases (pb) (Harmon and Wesley 1996). Mais tarde em 2000, foi proposto um *multiplex* PCR (mPCR) para a identificação de três espécies distintas: *A. butzleri*,

A. cryaerophilus e *A. skirrowii*, sendo estas as espécies com maior prevalência e que têm vindo a ser associadas a diferentes patologias em humanos e em animais (Houf et al. 2001b; Houf et al. 2000). Este mPCR utiliza diferentes pares de oligonucleótidos iniciadores com alvos nos genes *rRNA 16S* e *23S* permitindo a amplificação de diferentes fragmentos específicos de cada espécie, sendo este o método molecular mais utilizado a nível mundial para a deteção e diferenciação de espécies de *Arcobacter* (González et al. 2012; Houf et al. 2000).

Já em 2010, um novo m-PCR foi proposto, permitindo este a identificação de cinco espécies distintas: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. thereius* e *A. cibarius* recorrendo ao uso de oligonucleótidos iniciadores específicos para as diferentes espécies, e neste caso usando como genes alvo o *rRNA 23S* e o gene *GyrA* (Doudah et al. 2010). Devido ao reconhecimento de novas espécies, González et al. (2014) propuseram um novo PCR específico para a identificação do género *Arcobacter*, sendo este método desenhado de forma a amplificar uma região no gene *rRNA 16S* com 85 pb. Este método foi validado para aplicação em meio de enriquecimento, e assim apto para uma deteção rápida e sensível de espécies do género *Arcobacter* embora não as consiga distinguir (González et al. 2014).

Uma comparação entre os diferentes métodos acima referidos foi efetuada, na qual se concluiu que nenhum dos métodos pode ser considerado 100% fidedigno, pois todos apresentavam limitações ou falhas na identificação e diferenciação de espécies. Essas limitações podem ser parcialmente explicadas pelo uso limitado de sequências utilizadas para o desenho dos oligonucleótidos iniciadores específicos, tal como à descoberta e identificação de novas espécies deste género (Levican and Figueras 2013). Neste estudo, o mPCR descrito por Houf et al. (2000) demonstrou ser completamente confiável para a identificação da espécie *A. butzleri*, enquanto por outro lado o mPCR de Doudah et al. (2010) não é considerado confiável para essa mesma espécie, sendo no entanto fidedigno para as outras espécies, que permite identificar (Levican and Figueras 2013).

1.7 Genotipagem e diversidade genética

O uso de métodos de genotipagem permite a diferenciação entre estirpes da mesma espécie, permitindo assim avaliar a diversidade genética entre isolados, detetar possíveis contaminações cruzadas no ambiente e entre as diferentes amostras, construir árvores filogenéticas, e ainda oferecer informação epidemiológica das estirpes podendo até conseguir-se identificar o foco de contaminação ou infeção (Doudah et al. 2014).

No que se refere ao género *Arcobacter*, alguns métodos baseados na caracterização do genoma têm vindo a ser utilizados, conseguindo assim fazer-se uma avaliação e distinção ao nível de subespécie entre os diferentes isolados, através da análise dos diferentes perfis genéticos das estirpes, e elucidar acerca da distribuição tal como as possíveis vias de transmissão desta bactéria aos humanos (Lehner, Tasara and Stephan 2005). A maior parte dos métodos utilizados

para a distinção de estirpes baseia-se em reações em cadeia da polimerase, sendo os mais descritos para *Arcobacter*: o *random amplified polymorphic DNA-PCR* (RAPD-PCR), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR* (ERIC-PCR), e uma metodologia não dependente de amplificação a eletroforese de campo pulsado (PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis*). No entanto, embora todos eles apresentem vantagens, apresentam também desvantagens relativamente à sua reprodutibilidade, poder discriminatório e custo relacionado (Houf et al. 2002; Doudah et al. 2014).

O AFLP consiste na digestão do genoma completo do organismo, recorrendo a duas enzimas de restrição, seguindo-se uma amplificação por PCR detetando os fragmentos entre locais de restrição vizinhos (On, Harrington and Atabay 2003). Este método foi usado pela primeira vez para diferenciar as estirpes de *Arcobacter* spp., tendo sido relatado um alto nível de heterogeneidade obtendo-se 62 perfis distintos entre 72 isolados, sendo evidenciada a similaridade entre estirpes previamente identificadas como pertencentes à mesma espécie formando-se agrupamentos entre elas (On, Harrington and Atabay 2003). Por outro lado, com a utilização do RAPD-PCR são gerados marcadores através da amplificação por PCR de sequências aleatórias de DNA genómico através da utilização de oligonucleótidos iniciadores não direcionados (González et al. 2012). No entanto, este método é considerado limitado no que toca à sua reprodutibilidade, pois utiliza um único oligonucleótido iniciador inespecífico e temperaturas de hibridação baixas, mas mesmo assim é considerada uma técnica simples, e capaz de distinguir os isolados de *Arcobacter* (González and Ferrús 2011).

Outro método bastante utilizado na diferenciação genética de isolados de *Arcobacter* é o PFGE, sendo este considerado o melhor método molecular para avaliar a heterogeneidade genética de estirpes bacterianas (Lehner, Tasara and Stephan 2005). Esta metodologia baseia-se na comparação de padrões de grandes fragmentos de DNA genómico obtidos após a digestão do mesmo com enzimas de restrição de corte pouco frequente (González et al. 2012). O PFGE tem vindo a ser utilizado na diferenciação de estirpes de *Arcobacter* em diferentes amostras, tal como na tentativa de delinear as possíveis vias de transmissão desta bactéria a animais de consumo humano, ou na avaliação da possibilidade de contaminação entre alimentos distintos (Ferreira et al. 2013; Giacometti et al. 2015; Ho et al. 2006; Scarano et al. 2014). Quando comparado com outros métodos, o PFGE apresenta um grande poder discriminatório, e alta reprodutibilidade (González et al. 2012), mas por outro lado esta técnica apresenta algumas desvantagens como a complexidade do processo, sendo um processo muito moroso e dispendioso (Doudah et al. 2014).

Relativamente ao ERIC-PCR, este tem sido bastante explorado, e consiste na utilização de oligonucleótidos iniciadores direcionados a sequências repetitivas que ocorrem em várias cópias de alguns genomas bacterianos (González et al. 2012). Recorrendo ao uso deste método, foi já avaliada a diversidade genética em diferentes tipos de amostras tais como fezes de gado (Van Driessche et al. 2005), carcaças de porco (Van Driessche and Houf 2007), carne de aves e vaca,

esfregaços retais e vesículas biliares de animais bovinos (Aydin et al. 2007), tendo sido sempre relatada uma grande heterogeneidade de estirpes. Quando comparado com o RAPD-PCR, os resultados obtidos com o ERIC-PCR foram considerados mais reprodutíveis e complexos relativamente aos do RAPD-PCR (Houf et al. 2002). Um estudo comparativo entre diferentes métodos de tipagem mostrou que enquanto todos os isolados conseguiram ser caracterizados por ERIC-PCR, o mesmo não aconteceu para a tipagem por PFGE (94,5 %). Ambos os métodos demonstraram um elevado poder discriminatório, no entanto, o ERIC-PCR apresentou-se como uma técnica de tipagem genómica mais conveniente para análise de um grande número de isolados (Doudah et al. 2014).

1.8 Resistência a antimicrobianos

O aumento do número de relatos de isolamento de *Arcobacter* spp. a partir de uma grande diversidade de fontes a nível mundial, bem como a elevada frequência de resistência a diferentes antimicrobianos tem vindo a aumentar a relevância dada a este microrganismo. Ainda que o surgimento de antimicrobianos tenha melhorado a saúde pública, o seu uso exagerado pelo Homem, e a sua aplicação durante a criação de animais de consumo humano conduziu desenvolvimento de resistências devido a uma pressão seletiva, pondo assim em causa o tratamento eficaz de possíveis infeções graves (Rahimi 2014).

De forma semelhante ao que acontece numa infeção por *Campylobacter*, a prescrição de antimicrobianos nem sempre acontece, devido à autolimitação de alguns sintomas associados a enterites e bacteriemias causadas por *Arcobacter* spp. (Collado and Figueras 2011). No entanto, em caso de persistência e gravidade dos sintomas poderá ser necessário recorrer a um tratamento à base de antibióticos, sendo os descritos como eficazes as fluoroquinolonas e as cefalosporinas, no entanto também o uso de tetraciclinas, macrólidos e aminoglicosídeos tem sido recomendado (Collado and Figueras 2011; Ferreira et al. 2015). No entanto, e ao contrário do que acontece para o género *Campylobacter*, a inexistência de testes de suscetibilidade antimicrobiana sensíveis e desenhados para *Arcobacter* spp., e de pontos de corte de suscetibilidade a antibióticos específicos, pode dificultar a interpretação dos resultados obtidos, resultando na determinação de falsos perfis de resistência de *Arcobacter* spp., tal como impossibilitar a comparação entre trabalhos (Ferreira et al. 2015).

Dos estudos existentes relativamente à avaliação da resistência antimicrobiana deste género têm sido usados diferentes métodos de determinação de suscetibilidade a antibióticos, tais como o E-teste, diluição em agar, microdiluição, ou difusão por disco (Fera et al. 2003; Harrass, Schwarz, Wenzel 1998; Houf et al. 2004; Son et al. 2007; Vandenberg et al. 2006). Em alguns desses trabalhos, foram observadas elevadas taxas de suscetibilidade das estirpes obtidas de *Arcobacter* a partir de amostras humanas, alimentares ou até mesmo ambientais, a antimicrobianos como a eritromicina, a ciprofloxacina, a tetraciclina e a gentamicina (Son et al. 2007; Vandenberg et al. 2006). No entanto, elevadas frequências de resistência foram

descritas para antibióticos β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas (Ferreira et al. 2015). A multirresistência de isolados de *Arcobacter* foi previamente descrita por Son et al. (2007), tendo-se verificado resistência a dois ou mais antimicrobianos em 71,8 % dos isolados estudados, valor esse muito superior ao observado no caso dos isolados de *Campylobacter* também estudados, que apresentaram uma percentagem de multirresistência de apenas 28,4 % (Son et al. 2007). Esta multirresistência observada no género *Arcobacter* pode constituir um problema de saúde pública, dificultando ou até impossibilitando um tratamento eficaz e direcionado de possíveis infeções. As razões para este aumento de resistências associadas a este género têm sido atribuídas à exposição dos animais de consumo humano a diferentes antimicrobianos durante a sua criação assim como ao uso excessivo destas substâncias pela população humana (Ferreira et al. 2015).

Tendo em conta os dados existentes acerca de *Arcobacter* spp. e a sua emergência como agente patogénico alimentar, torna-se relevante aprofundar os estudos relativos à sua prevalência, diversidade e resistência a antibióticos.

Capítulo 2: Objetivos

A recente identificação de várias espécies novas do género *Arcobacter* e a presença destas bactérias em diversos ambientes, incluindo diferentes animais e humanos, assim como as potenciais patologias causadas pelo mesmo, tem vindo a aumentar o interesse no estudo deste agente patogénico de maneira a entender como podem afetar os seus hospedeiros. As espécies do género *Arcobacter*, que têm sido isoladas, encontram-se principalmente em animais de consumo humano e apresentam resistências a diversos antibióticos, o que poderá dificultar a aplicação terapêutica correta e eficaz aquando de uma infeção provocada por estas bactérias. Diversos estudos de incidência deste microrganismo em amostras alimentares têm vindo a ser feitos a nível global, no entanto em Portugal esses dados não existem. Assim, os objetivos propostos para a realização deste trabalho foram os seguintes:

- Estudar a prevalência de *Arcobacter* spp. em amostras de diferentes categorias alimentares recolhidas em comércio a retalho da Covilhã e Fundão;
- Identificar a diversidade genética entre os isolados obtidos das amostras contaminadas por *Arcobacter* spp.;
- Avaliar a resistência das estirpes identificadas quando sujeitas a diferentes classes de antibióticos.

Capítulo 3: Materiais e Métodos

3.1 Estirpes de referência

Ao longo da realização do trabalho de investigação foram usadas estirpes de referência, *A. butzleri* (LMG 10828 e LMG 6620), *A. cryaerophilus* (LMG 10829), *A. skirrowii* (LMG 6621) provenientes da coleção BCCM/LMG Bacteria collection (Universidade de Ghent, Bélgica), e *Escherichia coli* ATCC 25922, como controlos positivos de maneira a validar os resultados obtidos.

3.2 Armazenamento das estirpes

As estirpes de referência e as estirpes isoladas durante este trabalho passíveis de pertencerem ao género *Arcobacter* foram conservadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI, Liofilchem, Italy) com 20 % (v/v) de glicerol em tubos criogénicos, e armazenadas a uma temperatura de -80 °C. Anteriormente a cada ensaio, as estirpes foram inoculadas em placas de Blood Agar Base (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementadas com 5 % (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado (*Blood Agar* - BA), permitindo um crescimento ótimo e verificação da pureza de cada cultura. Relativamente, à estirpe de referência *Escherichia coli* o seu crescimento foi efetuado em *Müller-Hinton Agar* (MHA, Liofilchem, Italy).

3.3 Recolha das amostras alimentares

Cento e quinze amostras alimentares, incluindo 25 de carne de aves de capoeira (frango, peru e codorniz), 19 de carne de vaca, 24 de carne de porco, 1 amostra mista de carnes (vaca e porco), 25 de peixe fresco (salmão, carapau, cavala, truta, corvina, perca, pargo, choupas, robalo, dourada, solha, faneca, safio e verdinho) e 21 de vegetais embalados (agrião, espinafres, saladas variadas e mistas, cenoura ripada, rúcula e rebentos de soja) prontos a consumir, foram recolhidas para análise da presença de *Arcobacter* spp.. As amostras foram adquiridas em 7 supermercados e um talho, na região de Covilhã e Fundão. A amostragem foi efetuada no período de Abril de 2015 a Abril de 2016. Após a seleção e recolha dos produtos alimentares, estes foram transportados em condições de refrigeração até ao laboratório e processadas até um máximo de 4 horas após a recolha (Shah et al. 2012).

3.4 Enriquecimento das amostras alimentares

As amostras alimentares foram processadas em condições de assepsia, sendo que 10 g de produto alimentar, recolhido de forma representativa ao longo do mesmo, foram pesados para um saco de *stomacher* estéril e foram homogeneizados com 90 mL de *Arcobacter Broth* (AB) suplementado com Cefoperazona (8,0 mg/L), Anfotericina B (10,0 mg/L) e Teicoplanina (4,0 mg/L) (CAT Selective Supplement) (Oxoid, Hampshire, England), num Stomacher® (Biomaster Lab System Seward) durante 60 segundos a uma velocidade normal. Após a homogeneização de todas as amostras, os sacos foram fechados e incubados a 30 °C durante 48 h (Rivas, Fegan, and Vanderlinde 2004). Após o período de incubação, 400 µL dos meios de enriquecimento foram recolhidos e congelados para posterior análise.

3.5 Isolamento de *Arcobacter* spp. a partir das amostras enriquecidas

O plaqueamento das amostras alimentares após enriquecimento foi efetuado pelo método de filtração passiva descrito anteriormente por Collado et al. (2008). Assim, 200 µL de cada meio de enriquecimento foram aplicados sobre um filtro de celulose estéril com um poro de 0,45 µm, previamente colocado na superfície da placa com auxílio de uma pinça esterilizada. De seguida à aplicação dos meios de enriquecimento as placas foram incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após este período de tempo, o filtro foi retirado com a ajuda de uma pinça esterilizada, e o meio foi disperso na placa com uma ansa através de estrias permitindo assim o isolamento das colónias. As placas foram então incubadas a 30 °C durante 24 a 78 h e foram inspecionadas diariamente para observação da presença ou ausência de colónias típicas de *Arcobacter* spp.. No meio de agar de sangue as colónias deste género apresentam uma coloração acinzentada ou translúcida e um diâmetro entre 2 a 4 mm. Para cada amostra que apresentou colónias típicas, selecionaram-se pelo menos 4 colónias, as quais foram subcultivadas em BA. Após a seleção e passagem das colónias de cada amostra, as placas foram incubadas durante 24 a 48 h a 30 °C em condições de aerobiose, permitindo verificar a pureza das mesmas e um aumento da sua biomassa para posterior análise.

3.6 Identificação presuntiva dos isolados

Todos os isolados com características típicas de *Arcobacter* foram caracterizados fenotipicamente pelo teste da oxidase (Oxidase Test Stick, Liofilchem, Itália) e através de coloração de Gram. Os isolados positivos para o teste de oxidase e apresentando morfologia celular característica (bacilos Gram negativos, curvados) foram posteriormente armazenados como descrito na subseção 3.2.

3.7 Deteção molecular de *Arcobacter* spp.

De maneira a identificar os diferentes isolados como pertencentes ao género *Arcobacter* e seguidamente diferenciá-las nas diferentes espécies (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. thereuis* e *A. cibarius*) foram usados um PCR simples (González et al. 2014) e dois *multiplex* PCR (Houf et al. 2000; Doudah et al. 2010). A deteção molecular direta foi efetuada nos meios de enriquecimento utilizando a mesma metodologia. A extração de DNA foi efetuada pelo método de lise por fervura, onde parte da biomassa das colónias foi suspensa em 200 µL de água ultrapura esterilizada, sendo depois esta suspensão aquecida a 100°C durante 10 min para que ocorresse a lise celular. No caso dos meios de enriquecimento, os 400 µL recolhidos previamente foram sujeitos às mesmas condições que as suspensões celulares. Após a fervura, e consequente lise das células, os tubos foram centrifugados durante 3 min a uma rotação de 8000 rotações por minuto (rpm) para remoção dos detritos celulares, e o sobrenadante foi usado como *template* das reações de PCR.

Os isolados foram identificados primeiramente usando o PCR específico para género descrito por González et al. (2014). A mistura reaccional foi preparada num volume de 6,25 µL sendo constituída por 3,125 µL de Supreme NZYTaQ 2 x Green Master Mix (NZYTech, Lisbon, Portugal), contendo a enzima Taq DNA polimerase, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) e tampão de reação, 1 µM de cada oligonucleótido iniciador (Arco Fw e Arco Rv) (Tabela 3), 3 mM de cloreto de magnésio, 1 µL de água ultra pura e estéril e 0,5 µL de DNA previamente extraído. As condições do PCR foram: desnaturação inicial durante 3 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos, cada um composto por 30 seg de desnaturação a 95 °C, 30 seg de hibridação dos oligonucleótidos iniciadores a 60 °C e 30 seg de extensão a 72 °C, no final ocorreu um período de extensão final a 72 °C durante 7 minutos.

Após um resultado positivo como pertencentes ao género de interesse, foi feita a distinção entre as diferentes espécies, para tal foram utilizados dois mPCR's distintos. No PCR descrito por Houf et al. (2000), as reações foram preparadas com as seguintes condições: para um volume final de 6,25 µL foram adicionados 3,125 µL de Supreme NZYTaQ 2xGreen Master Mix, 2 mM de MgCl₂, 1 µM dos oligonucleótidos iniciadores Arco, Butz, Skir, Cry1 e Cry2 (Tabela 2), 0,5 µL de DNA e o volume foi perfeito com água ultra pura e estéril. As condições do PCR foram as

seguintes: 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos, cada um constituído por 30 seg a 95 °C, 30 seg a 61 °C e 30 seg a 72 °C, sendo feita uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos.

O segundo mPCR usado foi o descrito por Doudah et al. (2010), cuja mistura reaccional foi preparada num volume final por reação de 10 µL contendo água, 1× Dream Taq Green Buffer (ficando assim com uma concentração final de 2mM de MgCl₂), 200 µM de cada Trifosfato Desoxirribonucleótido (dNTPs), 0,5 µM de cada oligonucleótido iniciador (ButR, SkiR, TherR, CibR, ArcoF, GyraSF and GyraSR) e 0,25 U de Dream Taq DNA polimerase. As condições do PCR foram as seguintes: 3 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos, cada um composto por 30 seg a 95 °C, 30 seg a 58 °C e 90 seg a 72 °C, sendo feita uma extensão final a 72 °C durante 15 minutos. Em todos os ensaios foi usada pelo menos uma estirpe de referência como controlo positivo. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose de 1,5 % (p/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x e corado com Midori Green (Nippon Genetics Europe, Alemanha), sendo sempre aplicado um marcador de pesos moleculares (*Fast Ruler Low Range DNA* - Thermo-Fischer ou *GRS Universal Ladder* - GRiSP) e por fim os géis foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) num transiluminador (UVITEC, Cambridge).

Tabela 3: Sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados. Adaptado de (Doudah et al. 2010; González et al. 2014; Houf et al. 2000)

Gene alvo	Oligonucleótidos iniciadores	Sequencia (5'-3')	Referência
rRNA 16S	Arco Fw	GAGGATGACACATTTTCGGTGC	(González et al. 2014)
rRNA 16S	Arco Rv	GGAGTTAGCCGGTGCTTATTCATATA	
rRNA 16S	Arco	CGTATTCACCGTAGCATAGC	
rDNA 16S	Butz	CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA	(Houf et al. 2000)
rDNA 16S	Skir	GGCGATTTACTGGAACACA	
rDNA 16S	Cry1	TGCTGGAGCGGATAGAAGTA	
rDNA 16S	Cry 2	AACAACCTACGTCCTTCGAC	
rRNA 23S	ButR	TCCTGATACAAGATAATTGTACG	(Doudah et al. 2010)
rRNA 23S	TherR	GCAACCTCTTTGGCTTACGAA	
rRNA 23S	CibR	CGAACAGGATTCTCACCTGT	
Gyrase A	GyraseF	AGAACATCACTAAATGAGTTCTCT	
Gyrase A	GyraseR	CCAACAATATTTCCAGTYTTTGGT	
rRNA 23S	SkirR	TCAGGATACCATTAAGTTATTGATG	
rRNA 23S	ArcoF	GCYAGAGGAAGAGAAATCAA	

3.8 Genotipagem dos isolados

Terminada a identificação molecular dos diferentes isolados foi determinada a diversidade genética dos isolados por ERIC-PCR. Para tal, os isolados foram cultivados em placas de BA, as quais foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Após a incubação, procedeu-se a nova extração do DNA pelo método de lise por fervura, fazendo-se uma suspensão celular em 500 µL de água ultrapura esterilizada, seguindo-se a fervura a 100 °C durante 10 min. Após a lise celular os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 13000 rpm e recolhido o sobrenadante. O DNA

de dupla cadeia foi de seguida quantificado recorrendo-se a um NanoDrop e posteriormente ajustada a sua concentração para 25 ng/μL.

A reação de ERIC-PCR foi realizada num volume final de reação de 15 μL, contendo 1,5 μL de Tampão Dream Taq 10x, 0,8 U de Dream Taq DNA Polimerase, 4 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 200 μM de dNTPs, 0,5 μM de cada oligonucleótido iniciador (ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCC TGGGGATTAC-3' e ERIC2 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3') e 1 μL do DNA extraído a uma concentração de 25 ng/μL (Houf et al. 2002). As misturas reacionais foram amplificadas num termociclador (Biometra TProfessional Basic Gradient) considerando os seguintes parâmetros: um ciclo de desnaturação durante 5 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos em que cada um foi composto por 1 min de desnaturação a 94 °C, 1 min de hibridação dos oligonucleótidos iniciadores a 25 °C e 2 min de extensão a 72 °C. Terminados estes ciclos, a reação de PCR concluiu-se com um período de extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Concluída a reação, 10 μL dos produtos amplificados foram de seguida analisados por eletroforese em gel de agarose de 2 % (p/v) usando-se Midori Green como corante, tendo a corrida durado 2h 15 min a 120 Volts (V). Finalmente, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e os géis analisados para identificação dos perfis genéticos distintos. Apenas os fragmentos entre as 100 e as 2000 pares de bases (pb) foram considerados.

Após a tipagem de todos os isolados positivos, os padrões obtidos por ERIC-PCR foram analisados recorrendo ao *software* InfoQuest FP (versão 5.10). A configuração foi efetuada estabelecendo como parâmetro de otimização 0 %, e de tolerância de posição das bandas de 1 %. A análise de *clusters* foi efetuada pelo coeficiente de Dice usando o método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*).

3.9 Suscetibilidade antimicrobiana

De forma a avaliar a resistência ou suscetibilidade a antibióticos das estirpes selecionadas foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI) de nove antibióticos. A seleção das estirpes foi realizada após análise dos perfis genéticos obtidos por ERIC-PCR de todos os isolados positivos, tendo sido avaliada a resistência a antibióticos de todas as estirpes que apresentavam um perfil genético distinto, ou que pertencendo a amostras diferentes apresentavam perfil idêntico.

A determinação da concentração mínima inibitória foi efetuada recorrendo ao método de diluição em agar, segundo as recomendações do *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) para *Campylobacter* com algumas alterações (EUCAST 2000), para os nove antibióticos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Antibióticos usados na avaliação da suscetibilidade antimicrobiana das estirpes.

Antibiótico	Grau de pureza	Fornecedor
Ampicilina (sal de sódio)	-	Nzytech
Eritromicina	-	Sigma-Aldrich
Tetraciclina	98%	Sigma-Aldrich
Gentamicina	-	Sigma-Aldrich
Levofloxacina	98%	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacina	98%	Sigma-Aldrich
Ácido nalidíxico	-	Fischer Scientific
Cefotaxima (sal de sódio)	95%	Acros Organic
Cloranfenicol	99%	Sigma-Aldrich

Os diferentes antibióticos foram preparados nos solventes recomendados (EUCAST 2000) e diluídos a um intervalo de concentrações adequado para após adição de 1 mL da diluição a 19 mL de MHA suplementado com 5 % (v/v) de sangue desfibrinado de ovelha, permitir obter uma gama de concentrações de 256 a 0,06 µg/mL. As placas foram preparadas anteriormente ao ensaio, mas nunca mais de 48 h antes, sendo que as placas de tetraciclina foram sempre preparadas no dia do ensaio devido à sensibilidade deste antibiótico. Todas as placas foram armazenadas a 4°C até à realização do ensaio.

A suspensão bacteriana foi preparada por suspensão direta dos isolados previamente cultivados em BA durante 48 h a 30 °C. Assim suspenderam-se as colónias em solução salina de cloreto de sódio a 0,85 % (p/V) e ajustou-se a turbidez da suspensão a uma densidade de 0,5 McFarland. De seguida, os inóculos foram diluídos em solução salina numa placa de 96 poços estéril para obter uma concentração celular de 1×10^7 ufc/mL. As placas de Petri com as diferentes concentrações dos antibióticos foram inoculadas com auxílio de uma micropipeta multicanal, aplicando 2 µL de cada uma das suspensões padronizadas e diluídas. Após a secagem, as placas foram invertidas e incubadas a 30 °C durante 48 a 72 h. Em cada ensaio foi usada a estirpe de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 como controlo. Definiu-se como CMI a concentração mais baixa de antibiótico que inibiu o crescimento visível das bactérias em placa, sendo desprezados os casos em que uma colónia única aparecia, tal como uma névoa fraca na zona inoculada (EUCAST 2000). Os pontos de corte de resistência para os diferentes antibióticos testados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5: Pontos de corte de resistência dos diferentes antibióticos testados.

Antibiótico	Ponto de corte de resistência (µg/mL)	Referência
Ampicilina	>16	(CLSI 2015)
Eritromicina	>8	(EUCAST 2016)
Tetraciclina	>2	(EUCAST 2016)
Gentamicina	>8	(CLSI 2015)
Levofloxacina	>4	(CLSI 2015)
Ciprofloxacina	>2	(EUCAST 2016)
Ácido Nalidíxico	>16	(CLSI 2015)
Cefotaxima	>2	(CLSI 2015)
Cloranfenicol	>16	(CLSI 2015)

Capítulo 4: Resultados e Discussão

A procura e constante preocupação com o consumo de géneros alimentares de qualidade, isentos de compostos tóxicos, agentes patogénicos, e provenientes de uma criação sustentável tem vindo a aumentar. São vários os casos em que o consumo de alimentos contaminados por diferentes microrganismos estão diretamente associados a patologias em humanos, sendo estas doenças de origem alimentar consideradas de grande importância e risco pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no que toca à morbilidade e mortalidade humana. Estima-se que só em 2010, tenham surgido 600 milhões de doenças de origem alimentar, e com 420 000 mortes associadas a 32 doenças distintas de origem alimentar provocadas por diversos microrganismos e químicos (WHO 2015).

O género *Arcobacter* inclui diversas espécies de bactérias consideradas como agentes patogénicos emergentes, cujas fontes de contaminação mais prováveis têm sido referenciadas como sendo a água e alimentos (Collado and Figueras 2011). No entanto, apesar da apontada relevância deste microrganismo, até ao momento, somente um trabalho descreveu a presença de *Arcobacter* spp. em alimentos e ambiente de processamento alimentar em Portugal (Ferreira et al. 2013). Assim sendo, e considerando o papel de *Arcobacter* sp. como uma bactéria patogénica de origem alimentar, assim como a falta de informação relativamente à presença desta bactéria nos alimentos consumidos em Portugal, o objetivo deste trabalho foi analisar amostras pertencentes a diversas categorias alimentares recolhidas no comércio a retalho da região, e assim diretamente disponíveis ao consumidor final, quanto à prevalência do género *Arcobacter*.

4.1 Isolamento, caracterização e identificação molecular das amostras

Devido à escassez de dados referentes à prevalência de *Arcobacter* spp. em amostras alimentares em território Nacional, é importante efetuar uma avaliação de amostras de diferentes origens e categorias alimentares. Para tal, a recolha das amostras em comércio a retalho foi dividida em diferentes amostragens, sendo que foram selecionados alimentos pertencentes a cinco categorias distintas: vegetais embalados prontos a consumir, carne de aves, de porco, de vaca e peixe.

As amostras foram então recolhidas em comércio a retalho pertencentes aos concelhos da Covilhã e Fundão, e foram transportadas em condições de refrigeração até ao laboratório de maneira a que não sofressem qualquer tipo de alteração durante o transporte das mesmas. Aquando da chegada ao laboratório, estas foram manipuladas sobre condições de assepsia e adicionadas a meio de cultura seletivo por suplementação com três antibióticos distintos: ceforepazona, anfotericina B e teicoplanina (CAT), o qual permite uma seleção do

microrganismo em estudo inibindo o crescimento de microrganismos indesejados e que poderiam inviabilizar o processo de isolamento de *Arcobacter* spp.. Os meios de enriquecimento foram incubados durante 48h de maneira a favorecer o enriquecimento da amostra relativamente a diferentes espécies (Van Driessche et al. 2003; Van Driessche and Houf 2007), tal como o aumento na taxa de recuperação de isolados positivos (Hamill, Neill and Madden 2008; Scullion, Harrington and Madden 2004). O isolamento foi posteriormente efetuado pela metodologia de filtração passiva em placa de agar de sangue, filtração essa que limita a passagem de microrganismos, e assim o possível isolamento de outros géneros bacterianos que não *Arcobacter* spp. (Collado et al. 2008). O processo de isolamento, iniciando-se com uso de um passo de enriquecimento, seguindo por um passo de filtração passiva tem sido descrito e apresentado com o objetivo de inibir e remover microrganismos que não o de interesse (Houf et al. 2001b; Šilha, Šilhová-Hrušková and Vytřasová 2015).

Após a incubação dos meios de enriquecimento foi efetuada a deteção molecular do género *Arcobacter* nas amostras por avaliação desses meios através de um PCR convencional (González et al. 2014), seguindo-se a identificação ao nível de espécie nas amostras positivas por dois mPCR (Houf et al. 2000; Doudah et al. 2010). Relativamente ao passo de isolamento, as colónias de aspeto característico que mostraram resultado positivo quando submetidas ao teste de oxidase, e que apresentavam uma morfologia de bacilo curvo gram-negativos foram depois avaliadas também por PCR como descrito para os meios de enriquecimento.

A distribuição de *Arcobacter* spp. no total de 115 amostras analisadas encontra-se sumariada na Tabela 6 onde se encontram as percentagens de prevalência associadas às diferentes categorias alimentares recorrendo à identificação molecular através do uso de PCR nos meios de enriquecimento comparativamente com o obtido por cultura.

Tabela 6: Prevalência de *Arcobacter* spp. nas amostras recolhidas separadas por diferentes categorias alimentares, recorrendo a deteção molecular aplicada aos meios de enriquecimento, e usando cultura em paralelo seguida de identificação molecular dos isolados.

Categorias alimentares	Número de amostras positivas/ número de amostras totais por metodologia (%)	
	Deteção molecular no meio de enriquecimento	Isolamento por cultura
Vegetais Embalados	16/21 (76,2 %)	6/21 (28,6 %)
Carne de aves de capoeira	22/25 (88,0 %)	17/25 (68,0 %)
Carne de porco	14/24 (58,3 %)	9/24 (37,5 %)
Carne de vaca	9/19 (47,4 %)	7/19 (43,8 %)
Peixe	22/25 (88,0%)	14/25 (56,0 %)
Misto (carne de vaca e porco)	0/1 (0,0 %)	1/1 (100 %)
Total:	83/115 (72,2 %)	54/115 (47,0 %)

Em todas as categorias alimentares verificou-se uma elevada percentagem de deteção de *Arcobacter* spp., tal como para o isolamento, mostrando assim uma alta prevalência e distribuição destas bactérias patogénicas nos alimentos presentes em comércio a retalho na região.

Quando comparados os dois métodos de deteção, os resultados apresentados indicam um maior número de amostras positivas quando é realizado o PCR direto nos meios de enriquecimento relativamente ao isolamento das colónias deste género, obtendo-se assim resultados de amostras positivas totais com 72,2 % e 47,0 % respetivamente. Procedendo a esta avaliação por categoria alimentar, a regra mantém-se, tendo-se obtido sempre um maior número de amostras positivas recorrendo ao PCR direto dos meios de enriquecimento, exceto no caso de uma amostra mista (carne de porco e vaca) na qual o resultado da deteção molecular foi negativo, no entanto foi possível proceder ao isolamento de *A. butzleri* a partir desta amostra. Neste caso específico, pode ter ocorrido uma inibição da reação de PCR, tendo-se obtido assim um resultado negativo para a presença de *Arcobacter* spp..

Por outro lado, vários foram os casos de amostras para as quais a deteção molecular nos meios de enriquecimento foi positiva, não tendo sido possível depois isolar qualquer colónia a partir das placas. Isto pode dever-se ao facto de a deteção de bactérias em alimentos utilizando metodologias convencionais baseadas em cultura serem dependentes da viabilidade celular. Por sua vez a deteção molecular utilizando a técnica de PCR permite a análise de células viáveis e não viáveis, assim o resultado da deteção em meio de enriquecimento pode ser positivo sem

um isolamento posterior da bactéria de interesse (Fera et al. 2008). Um outro motivo para a diferença na percentagem de prevalência observada entre estes dois métodos, deve-se provavelmente ao crescimento da microflora competitiva acompanhante. Este crescimento pode impossibilitar o isolamento de colónias de *Arcobacter* spp. devido a uma sobreposição da microflora às colónias do género de interesse, que podem ser de tamanho e número reduzido aquando da observação das placas. A metodologia de isolamento usada tem sido descrita como a que tem maior sucesso no isolamento de diversas espécies de *Arcobacter* (Levican et al. 2014), no entanto, neste caso esta apresentou algumas desvantagens, pois foram várias as amostras que apresentavam crescimento com *swarming* nas placas impossibilitando, assim a recolha e identificação de possíveis colónias de *Arcobacter* spp.. Este comportamento pode estar associado ao facto de o método de isolamento usado ser efetuado na ausência de antibióticos, mas também devido à utilização de um meio de enriquecimento seletivo com um número de antibióticos reduzido e a concentrações insuficientes para a inibição da microflora competitiva acompanhante. Assim, várias têm sido as propostas de combinações de antibióticos que possam ajudar a ultrapassar este problema (Atabay and Corry 1997; Houf et al. 2001b; Merga et al. 2011), no entanto, o uso excessivo de antibióticos, ou a utilização de concentrações elevadas podem inibir o crescimento bacteriano do microrganismo de interesse. De facto, Houf et al. (2001) realizou um estudo de suscetibilidade a diferentes antibióticos utilizados nos meios propostos para o isolamento de *Arcobacter* spp. no qual se concluiu que diversos antibióticos podem ser adicionados a meios de cultura de maneira a torná-los seletivos, no entanto as concentrações têm que ser apropriadas para não levar à inibição do crescimento de algumas espécies de *Arcobacter*. Um exemplo apresentado pelos autores foi o caso dos isolados de *A. skirrowii* que apresentam mais suscetibilidade aos vários antibióticos testados quando comparados a isolados de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* (Houf et al. 2001a).

Os resultados apresentados para a deteção molecular em meio de enriquecimento e identificação de colónias isoladas derivam da utilização de três PCR's previamente desenhados especificamente para este género. O primeiro PCR a ser utilizado permite-nos averiguar a presença ou ausência de *Arcobacter* spp. isto é, após a reação de PCR, e posterior corrida de eletroforese, a análise do gel permite-nos identificar quais as amostras que transportam bactérias deste género por deteção de um fragmento de amplificação de 85 (pb) (González et al. 2014). Após a confirmação inicial de presença de *Arcobacter* spp. nas amostras foi efetuado um mPCR, desta vez um PCR múltiplo, permitindo-nos fazer a identificação entre três espécies através da diferença do peso molecular dos fragmentos obtidos para cada uma das espécies sendo elas: *A. cryaerophilus* (257 pb), *A. butzleri* (401 pb) e *A. skirrowii* (641 pb) (Houf 2000), este protocolo tem sido o mais utilizado a nível mundial (González et al. 2012). Quando o resultado obtido no mPCR específico para espécie descrito por Houf et al. (2000) foi negativo, ou positivo para *A. cryaerophilus* ou *A. skirrowii* foi efetuado o mPCR que permite fazer a distinção entre cinco espécies distintas obtendo cada uma delas um fragmento de amplificação característico: *A. skirrowii* (198 pb), *A. cryaerophilus* (395 pb), *A. cibarius* (1125 pb), *A.*

thereius (1590 pb) e *A. butzleri* (2061 pb) (Doudah et al. 2010). É assim importante salientar, que apenas a presença de cinco espécies deste género foram identificadas ao longo deste trabalho, podendo entre as amostras existir outras espécies que não foram detetadas com a utilização destes protocolos. A aplicação dos dois mPCR foi estabelecida tendo por base o estudo comparativo entre diferentes métodos moleculares aplicados à identificação de *Arcobacter* spp. efetuado por Levican et al. (2013). Os autores demonstraram que o mPCR desenhado por Houf et al. (2000) seria 100% confiável no que diz respeito à identificação de *A. butzleri* não tendo ocorrido nenhuma confusão com outra espécie deste género, por outro lado, espécies não incluídas como alvo na identificação geraram fragmentos de amplificação típicos de *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*. Quando utilizado o mPCR desenhado por Doudah et al. (2014) foi verificado que a espécie *A. butzleri* pode ser confundida, ao contrário das espécies *A. skirrowii*, *A. cibarius* e *A. thereius* apresentando resultados 100% confiáveis para a sua identificação (Levican and Figueras 2013). Exemplos dos resultados obtidos após as reações de amplificação podem ser observados nas seguintes figuras, estando representados três géis de eletroforese correspondendo aos resultados de cada PCR utilizado. Assim, na figura 4 é possível observar-se um gel de agarose ao qual foram aplicados os produtos reacionais do PCR descrito por Gonzalez et al. (2014) realizado a meios de enriquecimento ou isolados, verificando-se a presença de uma banda com tamanho de fragmento de cerca de 85 pb característica de *Arcobacter* spp. em todas as amostras e controlo positivo (Figura 4).

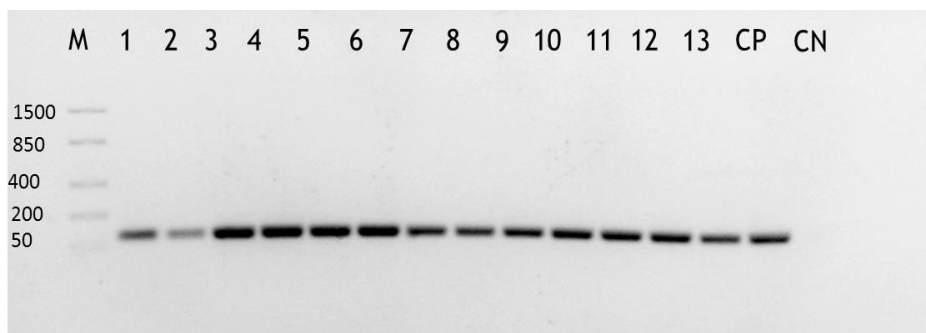


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de acordo com Gonzalez et al. (2014) para identificação de *Arcobacter* spp. nas diferentes amostras. M mostra o marcador de pesos moleculares (*Fast Ruler Low Range DNA*, Thermo-Fisher). Posição 1 a 13 representam diferentes amostras/isolados, CP é o controlo positivo representativo de uma estirpe de referência (LMG 10828 - *A. butzleri*) e CN o controlo negativo da reação de PCR.

Nas figuras 5 e 6, encontram-se apresentados exemplos das eletroforeses efetuadas para análise do tamanho dos fragmentos obtidos pelos mPCR descrito por Houf et al. (2000) (Figura 5) e por Doudiah et al. (2010) (Figura 6) e posterior identificação dos isolados a nível de espécie.

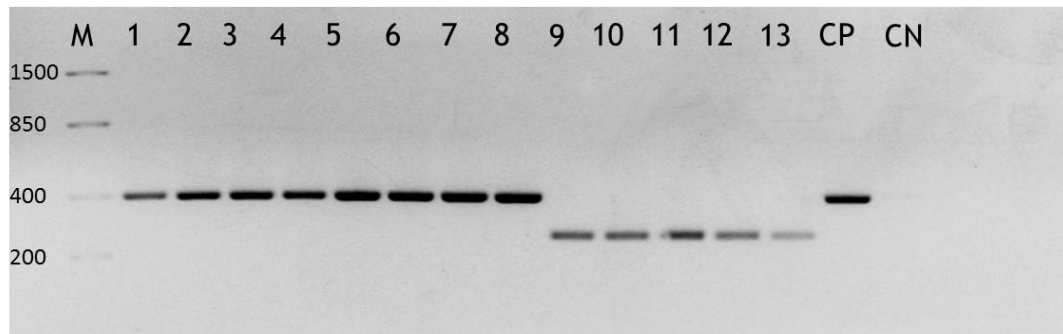


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do mPCR descrito por Houf et al. (2000) para identificação e diferenciação entre três espécies: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*. M mostra o marcador de pesos moleculares (*Fast Ruler Low Range DNA*). Posição 1 a 13 representam diferentes amostras/isolados, CP o controlo positivo relativo a uma estirpe de referência (LMG 10828 - *A. butzleri*) e CN o controlo negativo da reação de mPCR.

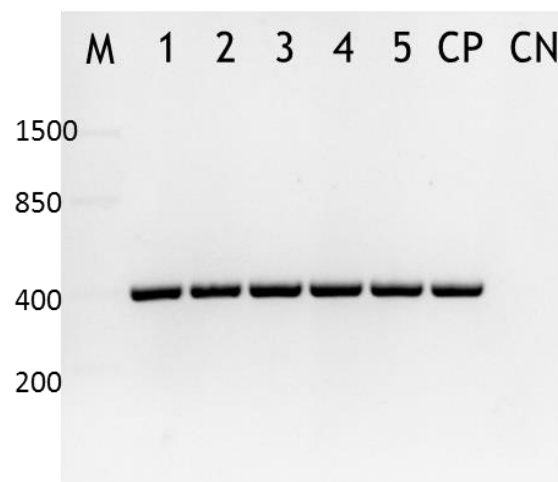


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos de amplificação do mPCR descrito por Doudiah et al. (2010) de diferentes amostras/isolados. M mostra o marcador de pesos moleculares (*Fast Ruler Low Range DNA*). Posição 1 a 5 representam diferentes amostras/isolados, CP uma estirpe de referência (LMG 10829 - *A. cryaerophilus*) e CN o controlo negativo da reação de PCR.

Relativamente à prevalência de *Arcobacter* nas diferentes categorias de alimentos, os resultados são semelhantes a diversos estudos já efetuados em outros Países. A alta incidência de *Arcobacter* spp. em amostras de carne de aves de capoeira por aplicação de métodos de isolamento por cultura tem sido reportada em amostras de comércios a retalho em diversos países como Polónia, Austrália, Japão, Tailândia e Republica Checa, onde se observaram valores de 48,8 a 100 % de prevalência neste tipo de amostras (Ferreira, Oleastro and Domingues 2016).

No presente estudo, a mesma tendência de elevados valores de prevalência de *Arcobacter* spp. em amostras alimentares recolhidas no comércio a retalho foi observada, sendo a carne de aves de capoeira a categoria alimentar com maior prevalência de *Arcobacter* spp. juntamente com as amostras de peixe analisadas obtendo-se 88,0 % de amostras positivas por deteção molecular no meio de enriquecimento em ambos os tipos de amostras, e com 68,0 % de amostras de aves e 56,0 % de amostras de peixe positivas após o isolamento e identificação das diferentes colónias isoladas. Apesar de o valor obtido para as amostras de carne de aves de capoeira se encontrar no intervalo reportado em diversos estudos, a prevalência de *Arcobacter* spp. neste estudo apresentou valores superiores aos previamente descritos na Alemanha (34,0 %) para peixe (Lehmann and Alter 2015).

Relativamente aos vegetais, poucos são os dados publicados, no entanto a prevalência até então reportada neste tipo de amostras é baixa quando comparados com os 76,2 % de amostras positivas obtidas ao longo deste trabalho quando o PCR foi efetuado ao meio de enriquecimento. Este valor diminui quando se analisam os resultados obtidos por isolamento, obtendo-se um valor de 28,6 % de amostras positivas, sendo ainda assim superior aos outros já reportados de 14 % (González and Ferrús 2011) e 27,5 % (Mottola et al. 2016). Considerando que as amostras vegetais analisadas correspondiam a produtos prontos a consumir sem necessidade de qualquer tratamento prévio, estes números podem ser preocupantes, com o consumo destes alimentos crus constituindo uma possível via de transmissão de *Arcobacter* spp. ao Homem.

Quanto às carnes de porco e vaca, estas têm sido também alvo de estudo em diversos Países com valores de prevalência variáveis. Enquanto num estudo não foi identificada a presença de *Arcobacter* spp. em nenhuma das duas categorias de carnes (Lee et al. 2010), outros estudos apresentaram prevalências superiores a 50% para amostras de carnes de porco (Collado, Guarro and Figueras 2009; Villarruel-lopez 2003), no entanto, com valores mais baixos para amostras de carne de vaca (Aydin et al. 2007; Zacharow et al. 2015). O mesmo acontece neste trabalho, quando observadas as percentagens de prevalência de *Arcobacter* spp. associadas à deteção molecular na qual se obteve 58,3 % de amostras positivas para a carne de porco, relativamente aos 47,4 % para as amostras de carne de vaca. No entanto quando comparados os valores de prevalência associada ao isolamento a partir das diferentes amostras, a percentagem das

amostras de carne de vaca apresentam um valor de prevalência superior às da carne de porco, obtendo-se 43,8 % e 37,5 % respectivamente.

No que respeita, à incidência das diferentes espécies, podemos observar na tabela 7 que a espécie mais recuperada foi *A. butzleri* (59,3 %), seguindo-se de *A. cryaerophilus* (35,2 %), e *A. skirrowii* (3,7 %). É de notar que em 5,6% das amostras positivas para *Arcobacter* spp. não foi possível determinar a espécie isolada pelos métodos usados, isto é, o resultado após a identificação molecular não foi conclusivo. Assim, poderão ter sido isoladas espécies que não são reconhecidas com a utilização dos mPCR's referidos anteriormente, pois permitem no total identificar apenas 5 espécies das 23 já reconhecidas. Fazendo a distinção entre as espécies pelas diferentes amostras, foi demonstrada uma prevalência de *A. butzleri* superior nas amostras de vegetais embalados, carne de aves de capoeira e porco, enquanto no caso das amostras de carnes de vaca e peixe a espécie mais prevalente foi *A. cryaerophilus*. Já a espécie *A. skirrowii* foi apenas isolada a partir de amostras de peixe, sendo assim esta categoria alimentar aquela na qual se conseguiu isolar um maior número de espécies de *Arcobacter*.

Tabela 7: Distribuição das espécies dos isolados de *Arcobacter* pelas diferentes categorias alimentares.

Categorias alimentares	Número de amostras positivas para espécie/ número de amostras totais positivas (%)			
	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>Arcobacter</i> sp.
Vegetais Embalados	4/6 (66,7 %)	1/6 (16,7 %)	0/6 (0,0 %)	1/6 (16,7 %)
Carne de aves de capoeira	15/17 (88,2 %)	2/17 (11,8 %)	0/17 (0,0 %)	0/17 (0,0 %)
Carne de porco	5/9 (55,6 %)	4/9 (44,4 %)	0/9 (0,0 %)	0/9 (0,0 %)
Carne de vaca	2/7 (28,6 %)	5/7 (71,4 %)	0/7 (0,0 %)	0/7 (0,0 %)
Peixe	5/14 (35,7 %)	7/14 (50,0 %)	2/14 (14,3 %)	2/14 (14,3 %)
Misto (carne de vaca e porco)	1/1 (100 %)	0/1 (0,0 %)	0/1 (0,0 %)	0/1 (0,0 %)
Total:	32/54 (59,3 %)	19/54 (35,2 %)	2/54 (3,7 %)	3/54 (5,6 %)

4.2 Genotipagem e diversidade genética dos isolados

Após o isolamento e identificação molecular das colónias das diferentes amostras, todos os isolados positivos foram genotipados através da metodologia de ERIC-PCR de maneira a inferir sobre a diversidade genética das amostras, e selecionar os isolados que seriam posteriormente analisados quanto à sua suscetibilidade a antibióticos.

A partir desta avaliação, verificou-se uma elevada diversidade genética entre os isolados, tendo-se obtido um total de 103 perfis genéticos entre 209 isolados identificados como *Arcobacter* spp. provenientes de 54 amostras (Tabelas 8 e 9). Observou-se também que a espécie com maior diversidade genética é *A. butzleri* com 66 perfis genéticos distintos em 122 isolados, seguindo-se a espécie *A. cryaerophilus* com 29 perfis genéticos entre 77 isolados. Já a espécie *A. skirrowii* não foi possível fazer uma avaliação concreta, pois apenas 5 isolados desta espécie foram obtidos, no entanto distinguiram-se 3 perfis de ERIC-PCR diferentes entre os mesmos. A metodologia de ERIC-PCR tem sido utilizada para a identificação taxonómica de possíveis novas espécies bacterianas, apresentando-se como uma ferramenta eficaz no estudo da epidemiologia associada a bactérias patogénicas (Doudah et al. 2014). Esta tem sido uma técnica vastamente utilizada para a avaliação da heterogeneidade genética do género *Arcobacter*, tendo apresentado um grande poder discriminatório, semelhante quando comparado ao PFGE, mostrando, no entanto vantagens relativamente a custos de execução e tempo de obtenção dos resultados (Doudah et al. 2014).

Tabela 8: Diversidade genética entre os isolados de *Arcobacter* spp. nas diferentes categorias alimentares.

Categorias alimentares	Número de amostras positivas	Número de isolados positivos	Número de perfis genéticos distintos
Vegetais Embalados	6	18	13
Carne de aves de capoeira	17	73	38
Carne de porco	9	33	13
Carne de vaca	7	23	8
Peixe	14	60	31
Misto (carne de vaca e porco)	1	2	1

Tabela 9: Diversidade genética das diferentes espécies de *Arcobacter* isoladas.

Número de estirpes/ número de isolados totais)					
Espécies	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>Arcobacter</i> sp.	Total
Estirpes	66/122	29/77	3/5	5/5	103/209

A figura 7 mostra-nos o resultado de uma corrida de eletroforese após a reação de ERIC-PCR, que serve de exemplo da avaliação da diversidade genética. Nas situações 1, 2 e 3 (delimitadas por chavetas), encontram-se em cada, quatro isolados pertencentes à mesma amostra, sendo que na situação 1 e 2 se observam dois perfis de ERIC-PCR diferentes por cada amostra assim apresentando uma situação onde se observa diversidade genética entre os isolados. Na situação 3 pode-se observar que todos os isolados daquela amostra apresentam o mesmo perfil genético. Na situação 4 encontram-se representados isolados provenientes de quatro amostras distintas, verificando-se o mesmo perfil genético entre as diferentes amostras. A presença do mesmo perfil de ERIC-PCR pode ser um indício de uma possível contaminação cruzada entre amostras, dado que são todas provenientes do mesmo estabelecimento de comércio a retalho, tendo sido recolhidas no mesmo dia (Figura 8), a contaminação pode ter-se dado por contacto com a superfície onde foram pesadas, material de corte ou manipulação, por exemplo. Essa possibilidade foi já reportada em carnes de porco vendidas em comércios a retalho (Van Driessche and Houf 2007), mostrando assim que é de grande importância adequar as regras de higiene e práticas de manipulação de alimentos não só durante o processo de cultivo dos alimentos e criação dos animais, mas também nos locais de processamento nos quais estes alimentos são manipulados.

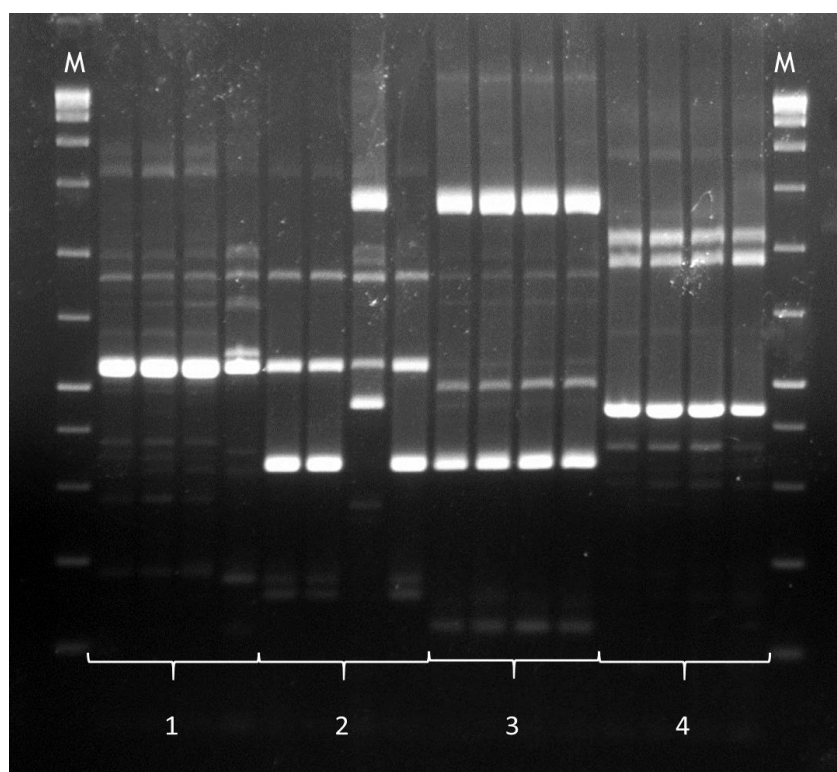


Figura 7: Padrões dos perfis genéticos dos isolados após genotipagem por ERIC-PCR. M representa o marcador de pesos moleculares (*GRS Universal Ladder*, GRiSP). As chavetas 1, 2 e 3 correspondem a três amostras diferentes estando representados quatro isolados de cada uma, enquanto a chaveta 4 apresenta quatro isolados correspondentes a quatro amostras diferentes (CR72-1, CR73-2, CR74-5 e CR75-4).

Após a avaliação da diversidade genética entre os isolados das amostras, através da técnica de ERIC-PCR, todos os isolados com diferentes perfis genéticos provenientes das mesmas amostras foram selecionados, tais como os isolados que apresentaram perfis idênticos mesmo sendo provenientes de amostras diferentes e foi avaliada a sua similaridade recorrendo a um alinhamento dos mesmos através de um dendograma (Figura 8).

Ao analisar a Figura 8, é de fácil percepção a heterogeneidade genética existente entre os diferentes isolados. No entanto, por visualização do gel de eletroforese resultante da reação de ERIC-PCR (Figura 7) é possível verificar uma homologia genética entre isolados provenientes de quatro amostras distintas. Essas mesmas amostras podem ser observadas no dendograma seguinte (Figura 8) detetando-se uma similaridade de 100% entre os quatro isolados (CR72-1, CR73-2, CR74-5 e CR75-4). Esta homologia apresenta-se como um indício evidente de uma possível contaminação cruzada entre amostras de duas categorias distintas (porco e vaca), a qual deve ter ocorrido durante a manipulação dos alimentos no local de recolha das amostras.

Estes resultados vêm demonstrar e reforçar a ideia de que ocorre a contaminação cruzada entre amostras de comércio a retalho é real, como também já foi descrito por De Smet et al., (2010) e Van Driessche & Houf, (2007a), o que contribuirá para disseminação e propagação do género *Arcobacter*.

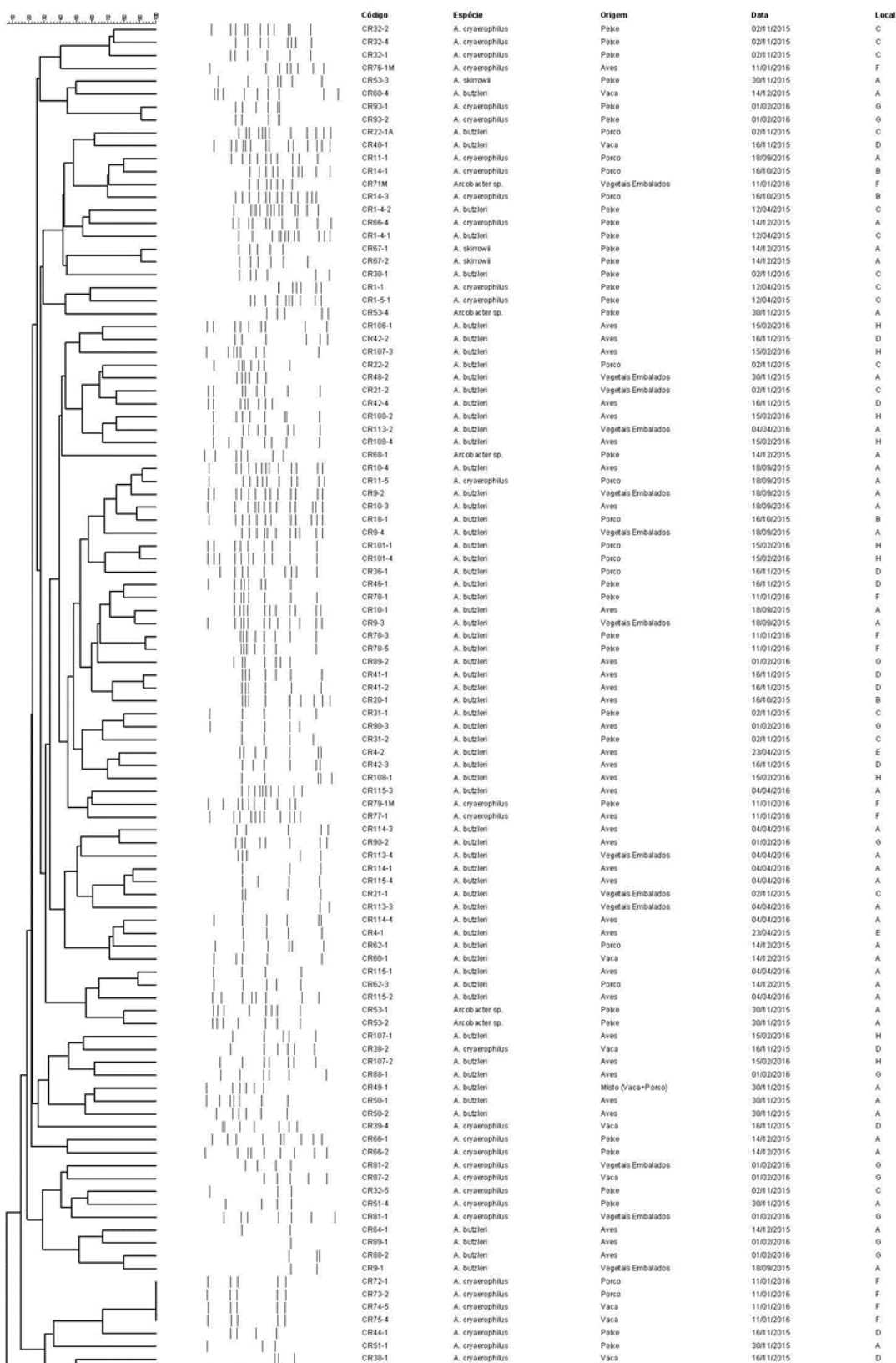


Figura 8: Comparação entre os isolados com base na sua similaridade genética.

4.3 Resistência a antibióticos das estirpes isoladas

Tal como o uso excessivo de antibióticos por parte da população em geral, também o uso de antibióticos em animais destinados ao consumo humano tem sido descrito como tendo um importante papel no aparecimento, aumento e disseminação de resistências aos antimicrobianos (Son et al. 2007). A contaminação de alimentos por bactérias resistentes pode permitir transferência de determinantes de resistências a antibióticos a outras bactérias patogénicas, e levar a um tratamento ineficaz das infeções por esses microrganismos (Rahimi 2014). Assim, sendo o género *Arcobacter* considerado um agente patogénico emergente de origem alimentar de elevada prevalência em alimentos de consumo humano, é importante avaliar a resistência das estirpes isoladas a partir dos diversos alimentos, submetendo-as a testes de suscetibilidade a antibióticos utilizados na área clínica e veterinária.

Para tal, foi avaliada a suscetibilidade a antibióticos das 106 estirpes que apresentaram perfis de ERIC-PCR únicos ou perfis idênticos mas proveniência de amostras diferentes, usando para tal a determinação da concentração mínima inibitória pelo método de diluição em agar. A suscetibilidade foi avaliada relativamente a nove antibióticos pertencentes a 8 classes distintas: penicilinas, macrolídeos, tetraciclina, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, quinolonas, cefalosporinas e fenicóis, sendo estes utilizados em casos clínicos associados a infeções por *Campylobacter* spp. (Ferreira et al. 2015).

Analisando os resultados (Tabela 10), consegue observar-se uma frequência de resistência elevada a três antibióticos distintos, a tetraciclina, o ácido nalidíxico e a cefotaxima tendo-se obtido percentagens de resistência superiores a 90 %. Os estudos de suscetibilidade antimicrobiana relevaram também uma taxa de resistência considerável quando avaliada a suscetibilidade das estirpes ao cloranfenicol e ampicilina obtendo-se resistência em 65,1 % e 44,3 %, respetivamente. Relativamente à levofloxacina e ciprofloxacina as percentagens de resistência das estirpes foram mais baixas atingindo-se 18,9 % e 21,7 %, respetivamente. Estas percentagens de resistência são superiores às descritas por outros estudos anteriores a 2012 nos quais as resistências às fluoroquinolonas apresentaram frequências entre 0 % e 4,4 %, tendo nesses casos sido esta classe de antibióticos sugerida para o tratamento de doenças associadas à infeção por espécies deste género (Ferreira et al. 2015). Neste trabalho, Verificou-se que as estirpes estudadas eram mais susceptíveis à fluoroquinolona levofloxacina, como previamente descrito por Fera et al.(2003). O aumento da resistência a esta classe de antibióticos, como é reportada neste trabalho, pode advir de uma capacidade de resistência que se tem vindo a adquirir devido a uma pressão seletiva por exposição a estes agentes. Os antibióticos para os quais se observou uma maior suscetibilidade das estirpes analisadas foram a eritromicina com apenas sete estirpes resistentes, e a gentamicina para a qual não foi observada resistência. Considerando as percentagens de resistência das diferentes estirpes à tetraciclina, de um modo geral a frequência de resistência observada foi a mais elevada variando os resultados entre 83,9

% e 100 %, estes valores são mais elevados do que os apresentados por outros estudos nos quais a resistência à tetraciclina observada é reduzida ou inexistente (Abay et al. 2011; Son et al. 2007; Rahimi 2014). Nos testes de suscetibilidade ao ácido nalidíxico, as estirpes mostraram uma alta frequência de resistência tendo sido a percentagem mais baixa obtida de 83,9 % e a mais elevada de 100 %, com um valor global de 92,5 %, tendo valores similares sido descritos em diversos trabalhos (Rahimi 2014; Abay et al. 2011; Son et al. 2007). Do mesmo modo as estirpes apresentaram também valores de resistência de 92,5% à cefotaxima, valor bastante mais elevado quando comparado com os 33,4 % obtidos a partir de animais de gado saudáveis (Shah et al. 2012). Por fim, a resistência ao cloranfenicol foi também elevada, com 65,1 % de resistência das estirpes analisadas. A resistência ao cloranfenicol tem sido reportada de maneira diferencial, isto é, atingido valores de resistência variáveis entre os diferentes estudos (Ferreira et al. 2015).

Tabela 10: Suscetibilidade antimicrobiana de *Arcobacter* spp. isolado a partir amostras alimentares recolhidas em comércio a retalho.

Antibióticos	Categorias Alimentares						Total:
	Número de estirpes resistentes/Número de estirpes totais (% Resistência)						
	Vegetais Embalados	Carne de aves de capoeira	Carne de porco	Carne de vaca	Peixe	Misto (carne de vaca e porco)	
Ampicilina	3/13 (23,1%)	18/38 (47,4%)	3/14 (21,4%)	3/9 (33,3%)	14/31 (45,2%)	0/1 (0,0%)	42/106 (44,3%)
Eritromicina	0/13 (0,0%)	6/38 (15,8%)	1/14 (7,1%)	0/9 (0,0%)	0/31 (0,0%)	0/1 (0,0%)	7/106 (6,6%)
Tetraciclina	12/13 (92,3%)	35/38 (92,1%)	14/14 (100%)	8/9 (88,9%)	26/31 (83,9%)	1/1 (100%)	97/106 (91,5%)
Gentamicina	0/13 (0,0%)	0/38 (0,0%)	0/14 (0,0%)	0/9 (0,0%)	0/31 (0,0%)	0/1 (0,0%)	0/106 (0%)
Levofloxacina	0/13 (0,0%)	15/38 (39,5%)	1/14 (7,1%)	0/9 (0,0%)	3/31 (9,7%)	0/1 (0,0%)	20/106 (18,9%)
Ciprofloxacina	0/13 (0,0%)	17/38 (44,7%)	2/14 (14,3%)	0/9 (0,0%)	3/31 (9,7%)	0/1 (0,0%)	23/106 (21,7%)
Ácido Nalidíxico	11/13 (84,6%)	38/38 (100%)	13/14 (92,9%)	8/9 (88,9%)	26/31 (83,9%)	1/1 (100%)	98/106 (92,5%)
Cefotaxima	13/13 (100%)	38/38 (100%)	13/14 (92,9%)	9/9 (100%)	23/31 (74,2%)	1/1 (100%)	98/106 (92,5%)
Cloranfenicol	9/13 (69,2%)	31/39 (79,5%)	10/14 (71,4%)	6/9 (66,7%)	12/31 (38,7%)	1/1 (100%)	69/107 (65,1%)

Quando observada a resistência das estirpes aos diferentes antibióticos nas diferentes categorias alimentares, podem-se tirar algumas conclusões. Relativamente à ampicilina, as taxas de resistência observadas não variam muito conforme a origem dos isolados testados, obtendo-se uma percentagem de resistência superior nas amostras de carnes de aves de capoeira com 47,4 % dos isolados resistentes. A resistência a este antibiótico foi previamente observada em 43,75 % das amostras de vísceras de frango analisadas na Costa Rica (Villalobos et al. 2013), e em diferentes amostras de aves com 60,6% dos isolados resistentes no Irão (Rahimi 2014). No caso da eritromicina, apenas os isolados das amostras de carne de aves e porco apresentaram resistência com uma frequência de 15,8 % e 7,1 %, respectivamente. A resistência à eritromicina tem vindo a ser pouco reportada (Son et al. 2007; Ferreira et al. 2015), estando assim de acordo com os resultados obtidos. No que diz respeito às fluoroquinolonas, esta é a classe de antibióticos onde se observa uma maior disparidade entre as taxas de resistência observadas para cada categoria de alimentos, sendo que na carne de aves de capoeira se obteve uma frequência de resistência de 39,5 % para a levofloxacina e 44,7 % para a ciprofloxacina, valores muito superiores aos apresentados para os outros tipos de alimentos. Assim, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os anteriormente obtidos a partir de isolados provenientes de um matadouro de aves em Portugal onde foi descrita uma frequência de resistência de 55,4 % das estirpes à ciprofloxacina (Ferreira et al. 2013). Os autores justificaram estes elevados valores de frequência de resistência às fluoroquinolonas pelo facto de em Portugal a criação de aves de capoeira ainda ser suplementada com derivados desta classe de antibióticos (Ferreira et al. 2013), esta poderá também ser uma justificação para as diferenças observadas no presente trabalho.

A Tabela 11 apresenta a distribuição de resistência antimicrobiana das estirpes obtidas fazendo a distinção entre as diferentes espécies isoladas. Por observação da Tabela 11, pode verificar-se que a espécie cujas estirpes apresentam menor suscetibilidade é *A. butzleri*, com as seguintes percentagens de resistência: 47 % para a ampicilina, 10,6 % para a eritromicina, 95,5 % para a tetraciclina, 22,7 % para a levofloxacina, 27,3 % para a ciprofloxacina, 100 % para o ácido nalidíxico, 98,5 % para a cefotaxima e 87,9 % para o cloranfenicol. É de notar que as resistências observadas à eritromicina foram exclusivas a esta espécie, já por outro lado as estirpes de *A. skirrowii* não mostraram resistência a nenhum dos antibióticos em estudo.

Tabela 11: Distribuição da resistência antimicrobiana de 106 estirpes de *Arcobacter* isoladas a partir amostras alimentares recolhidas em comércio a retalho.

		Número de isolados suscetíveis ao seguinte CMI (µg/mL)															
Antibióticos	Espécie	≤0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	1	<2	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Ampicilina	<i>A. butzleri</i>									8	15	12	16	15			
	<i>A. cryaerophilus</i>									6	7	9	10				
	<i>A. skirrowii</i>									1		2					
	<i>Arcobacter sp.</i>							2		2		1					
Eritromicina	<i>A. butzleri</i>			1		4	17		28	9	1	3	4				
	<i>A. cryaerophilus</i>				1	4	11		14	2							
	<i>A. skirrowii</i>			1	2												
	<i>Arcobacter sp.</i>			3	2												
Tetraciclina	<i>A. butzleri</i>								3	13	21	23	5	1			
	<i>A. cryaerophilus</i>						2			10	19	1					
	<i>A. skirrowii</i>						3										
	<i>Arcobacter sp.</i>						2			1	2						
Gentamicina	<i>A. butzleri</i>			6	44	17											
	<i>A. cryaerophilus</i>	1		2	25	4											
	<i>A. skirrowii</i>				2	1											
	<i>Arcobacter sp.</i>	1		1		3											
Levofloxacina	<i>A. butzleri</i>			3	15	14	12		4	3		9	6				
	<i>A. cryaerophilus</i>			7	10	11						3	1				
	<i>A. skirrowii</i>	1		2													
	<i>Arcobacter sp.</i>			4	1												
Ciprofloxacina	<i>A. butzleri</i>	6	19	18	3	2				5	11	1	1				
	<i>A. cryaerophilus</i>	6	13	9							3	1					
	<i>A. skirrowii</i>	1	2														
	<i>Arcobacter sp.</i>		4	1													
Ácido Nalidixico	<i>A. butzleri</i>												4	16	16	9	21
	<i>A. cryaerophilus</i>											4	12	12		1	3
	<i>A. skirrowii</i>										1	2					
	<i>Arcobacter sp.</i>										2		3				
Cefotaxima	<i>A. butzleri</i>								1	12	26	19	8				
	<i>A. cryaerophilus</i>								2	4	12	14					
	<i>A. skirrowii</i>						1		2								
	<i>Arcobacter sp.</i>						2		1			1	1				
Cloranfenicol	<i>A. butzleri</i>								2		2	5	19	20	13	6	
	<i>A. cryaerophilus</i>									1	2	18	11				
	<i>A. skirrowii</i>								1	2							
	<i>Arcobacter sp.</i>								2	1	2						

A zona marcada a cinza representa a zona de resistência dos diferentes antibióticos em estudo

Uma estirpe é considerada multirresistente quando apresenta resistência a três ou mais antibióticos distintos. pela tabela 11 é possível verificar que as estirpes em estudo apresentam de um modo geral uma multirresistência a diferentes antibióticos, sendo que esta multirresistência das estirpes de *Arcobacter* spp. já tinha sido reportada por Son et al. (2007). Percentagens elevadas de multirresistência foram igualmente identificadas, em que 80,9% dos isolados de *A. butzleri* recuperados a partir de amostras humanas e animais eram capazes de crescer na presença de diversos antibióticos (Abay et al. 2011). No entanto, o fato de não existirem critérios internacionais estabelecidos referentes aos pontos de corte específicos para *Arcobacter* spp. e qual o melhor método a utilizar para se efetuar os estudos de suscetibilidade antimicrobiana (Son et al. 2007), pode resultar numa avaliação incorreta e incompleta da resistência deste género.

Relativamente aos resultados obtidos neste estudo, consegue-se através da análise da Tabela 12 observar-se uma multirresistência de 94 estirpes das 106 (88,7%) estudadas, um valor muito elevado, verificando-se casos em que a resistência é transversal a sete dos nove antibióticos em estudo correspondendo a 8 classes de antibióticos.

Tabela 12: Perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes selecionadas.

Estirpe	Categoria Alimentar	Espécie	Perfil de Resistência
CR1-1	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx
CR1-4-1	Peixe	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Chl
CR1-4-2	Peixe	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR1-5-1	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx
CR4-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Ery, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR4-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR9-1	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx
CR9-2	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR9-3	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal Cfx, Chl
CR9-4	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR10-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR10-3	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR10-4	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx
CR11-1	Porco	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx
CR11-5	Porco	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx
CR14-1	Porco	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx
CR14-3	Porco	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet
CR18-1	Porco	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR20-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR21-1	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR21-2	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR22-1	Porco	<i>A. butzleri</i>	Ery, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR22-2	Porco	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR30-1	Peixe	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR31-1	Peixe	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR31-2	Peixe	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR32-1	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR32-2	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx
CR32-4	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx
CR32-5	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR36-1	Porco	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR38-1	Vaca	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx
CR38-2	Vaca	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx
CR39-4	Vaca	<i>A. cryaerophilus</i>	Cfx, Chl
CR40-1	Vaca	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR41-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR41-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR42-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR42-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR42-3	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR42-4	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Ery, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR44-1	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx
CR46-1	Peixe	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx
CR48-2	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR49-1	Misto Vaca e Porco	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR50-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR50-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Ery, Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR51-1	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR51-4	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR53-1	Peixe	<i>Arcobacter</i> sp.	Cfx
CR53-2	Peixe	<i>Arcobacter</i> sp.	-
CR53-3	Peixe	<i>A. skirrowii</i>	-
CR53-4	Peixe	<i>Arcobacter</i> sp.	Tet, Nal
CR60-1	Vaca	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR60-4	Vaca	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR62-1	Porco	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR62-3	Porco	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR64-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Ery, Tet, Nal, Cfx, Chl

Tabela 12: Perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes selecionadas (continuação).

Estirpe	Categoria Alimentar	Espécie	Perfil de Resistência
CR66-1	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal
CR66-2	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx
CR66-4	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR67-1	Peixe	<i>A. skirrowii</i>	-
CR67-2	Peixe	<i>A. skirrowii</i>	-
CR68-1	Peixe	<i>Arcobacter</i> sp.	Tet, Nal
CR71M	Vegetais Embalados	<i>Arcobacter</i> sp.	Tet, Nal, Cfx
CR72-1	Porco	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR73-2	Porco	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR74-5	Vaca	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR75-4	Vaca	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR76-1M	Aves	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx
CR77-1	Aves	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR77-9	Aves	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR78-1	Peixe	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR78-3	Peixe	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR78-5	Peixe	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR79-1M	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx
CR81-1	Vegetais Embalados	<i>A. cryaerophilus</i>	Cfx
CR81-2	Vegetais Embalados	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Cfx
CR87-2	Vaca	<i>A. cryaerophilus</i>	Tet, Nal, Cfx
CR88-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Ery, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR88-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR89-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx
CR89-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx
CR90-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR90-3	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR93-1	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx
CR93-2	Peixe	<i>A. cryaerophilus</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx
CR101-1	Porco	<i>A. butzleri</i>	Tet, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR101-4	Porco	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR106-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR107-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR107-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR107-3	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Ery, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR108-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR108-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR108-4	Aves	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR113-2	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR113-3	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR113-4	Vegetais Embalados	<i>A. butzleri</i>	Tet, Nal, Cfx, Chl
CR114-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR114-3	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Lev, Cip, Nal, Cfx, Chl
CR114-4	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Nal, Cfx, Chl
CR115-1	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Lev, Cip, Nal, Cfx
CR115-2	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Lev, Cip, Nal, Cfx
CR115-3	Aves	<i>A. butzleri</i>	Cip, Nal, Cfx
CR115-4	Aves	<i>A. butzleri</i>	Amp, Tet, Cip, Nal, Cfx, Chl

Amp - Ampicilina; Ery - Eritromicina; Tet - Tetraciclina; Lev - Levofloxacina; Cip - Ciprofloxacina; Nal - Ácido Nalidíxico; Cfx - Cefotaxima; Chl - Cloranfenicol.

Os valores elevados de resistência das diferentes estirpes pode estar associado à pressão seletiva que é criada pela utilização excessiva de antibióticos (Rahimi 2014) nos processos de produção de animais de consumo humano, utilizados na tentativa de tornar o processo mais rápido e rentável para quem o desenvolve. Assim, é necessário rever as autorizações e limites de utilização de antibióticos em processos de produção de produtos alimentares de maneira a evitar qualquer tipo de transferência de resistências que possam dificultar ou impossibilitar o tratamento de patologias causadas pela infecção por *Arcobacter* spp. (Son et al. 2007). É também importante a criação de um método de avaliação da suscetibilidade antimicrobiana adequado e desenhado para este microrganismo, pois a falta de um protocolo sensível, e pontos de corte fixos e específicos deste género podem resultar em uma interpretação incompleta ou errada dos resultados obtidos e por sua vez dificulta a comparação de dados entre dos diferentes estudos (Ferreira et al. 2015).

Tendo *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* sido considerados um risco elevado para a saúde humana (ICMSF 2002), pode a sua elevada prevalência em alimentos comercializados para consumo humano ser preocupante, principalmente quando associada a uma elevada taxa de resistência a diversos antibióticos. Assim, a resistência a antibióticos apresentada por este microrganismo poderá ter um papel relevante tanto na ineficácia do tratamento de infeções por ele causadas, mas também na transferência de determinantes de resistência a outras bactérias patogénicas.

Capítulo 5: Conclusões

Devido à inexistência de dados relativos à prevalência de *Arcobacter* spp. em alimentos vendidos em comércio a retalho em território nacional, o objectivo principal deste trabalho foi assim inferir sobre a prevalência destas bactérias em diferentes categorias alimentares e contribuir para um melhor conhecimento acerca da distribuição e resistência deste microrganismo.

No presente trabalho foram estudadas cento e quinze amostras, tendo-se obtido uma taxa de prevalência de *Arcobacter* spp. elevada, nas diferentes categorias alimentares em estudo (vegetais embalados, carnes de aves de capoeira, carne de porco, carne de vaca e peixe). Foram registadas 72,2 % das amostras positivas quando se procedeu a uma deteção molecular diretamente ao meio de enriquecimento das mesmas, e 47,0 % de amostras positivas quando se efetuou o processo de isolamento seguido pela identificação molecular de todos os isolados obtidos.

Relativamente à incidência das diferentes espécies do género *Arcobacter*, observou-se uma maior prevalência da espécie *A. butzleri* presente em 59,3% das amostras, seguindo-se *A. cryaerophilus* com 35,2 %. A espécie *A. skirrowii* foi também isolada a partir de 3,7 % das amostras, e foram ainda identificadas 5,6 % das amostras contaminadas com *Arcobacter* sp. para as quais não foi possível identificar a espécie. Nalgumas das amostras houve co-isolamento, o que significa a presença de mais do que uma espécie de *Arcobacter* na mesma amostra.

A diversidade genética entre os isolados positivos foi também avaliada, conseguindo-se identificar 104 perfis genéticos distintos, entre as 54 amostras nas quais foi detetada a presença de *Arcobacter* spp. A espécie que apresentou maior heterogeneidade genética foi a *A. butzleri* na qual se distinguiram 66 genótipos, seguindo-se *A. cryaerophilus* com 29 genótipos, *A. skirrowii* com 3 e *Arcobacter* sp. com 5 genótipos diferentes. A possibilidade de contaminação cruzada foi também demonstrada, através da homologia entre perfis genéticos de isolados pertencentes a quatro amostras distintas recolhidas no mesmo local.

A suscetibilidade das estirpes de *Arcobacter* isolada a nove antibióticos foi também testada, obtendo-se uma percentagem de resistência para a ampicilina de 44,3 %, eritromicina de 6,6 %, tetraciclina de 91,5 %, levofloxacina de 18,9 %, ciprofloxacina de 21,7 %, cloranfenicol de 65,1 % e valores de resistência iguais para o ácido nalidíxico e cefotaxima de 92,5 %. Não foi observada resistência na presença de gentamicina podendo este amiglicósídeo ser uma boa aposta na terapêutica de infeções por *Arcobacter* spp. A espécie que se mostrou como a mais resistente foi a *A. butzleri* tendo sido a única na qual foi detetada resistência para a eritromicina, sendo todas as outras espécies suscetíveis a este macrólido. Verificou-se ainda

uma multirresistência em 88,7 % das estirpes estudadas, tendo mesmo sido identificada em alguns dos isolados resistência a sete dos nove antibióticos testados. Esta multirresistência pode assim dificultar e até impossibilitar um tratamento eficaz e direcionado de possíveis infecções por este microrganismo, sendo assim necessário alertar a população em geral para os riscos que estas resistências podem transportar, e definir uma estratégia de tratamento eficaz e direcionado a esta bactéria considerada um patógeno emergente.

Em suma, com o presente trabalho, foi possível estudar a prevalência de *Arcobacter* em amostras de diversas categorias alimentares, avaliar a sua presença através de dois métodos distintos, avaliar a diversidade genética entre os isolados obtidos e ainda avaliar a resistência das estirpes isoladas a vários antibióticos. Estes dados reforçam assim a ideia de que a presença e infecções associadas às diferentes espécies de *Arcobacter* possam estar a ser subvalorizadas.

Perspetivas Futuras

Considerando a emergência de *Arcobacter* spp. e a relevância de várias das suas espécies com agentes patogénicos, verifica-se a necessidade de se estabelecer e padronizar metodologias que permitam uma real avaliação da sua distribuição, tal como uma identificação inequívoca das espécies deste género e adequada avaliação dos seus padrões de resistência. Assim, será importante em trabalhos futuros:

- Estudar em paralelo diversos métodos de isolamento na tentativa de estabelecer quais as melhores condições de cultura de *Arcobacter* spp.
- Melhorar ou desenhar novos PCR's de deteção de género e distinção de espécie de maneira a que se evitem resultados inconclusivos;
- Estabelecer pontos de corte específicos para este género, tal como um método padrão para a avaliação correta da resistência antimicrobiana destas bactérias permitindo assim uma comparação coerente com os dados que têm vindo a ser publicados.

Bibliografia

- Abay, S., Kayman, T., Hizlisoy, H., Aydin, F. 2011. "In Vitro Antibacterial Susceptibility of *Arcobacter butzleri* Isolated from Different Sources." *Journal of Veterinary Medical Science* 74 (5): 613-616.
- Abdelbaqi, K., Buissonnière, A., Prouzet-Mauleon, V., Gresser, J., Wesley, I., Mégraud, F., Ménard, A. 2007. "Development of a Real-Time Fluorescence Resonance Energy Transfer PCR to Detect *Arcobacter* Species." *Journal of Clinical Microbiology* 45 (9): 3015-3021.
- Atabay, H. I., Unver, A., Sahin, M., Otlu, S., Elmali, M., Yaman, H. 2008. "Isolation of Various *Arcobacter* Species from Domestic Geese (*Anser Anser*)." *Veterinary Microbiology* 128 (3-4): 400-405.
- Atabay, H.I., Corry, J. E. 1997. "The Prevalence of *Campylobacters* and *Arcobacters* in Broiler Chickens." *Journal of Applied Microbiology* 83 (5): 619-626.
- Atabay, H.I., Wainø M., Madsen, M. 2006. "Detection and Diversity of Various *Arcobacter* Species in Danish Poultry." *International Journal of Food Microbiology* 109 (1-2): 139-145.
- Atabay, H.I., Corry, J. E., On, S. L. 1997. "Isolation and Characterization of a Novel Catalase-Negative, Urease-Positive *Campylobacter* from Cattle Faeces." *Letters in Applied Microbiology* 24 (1): 59-64.
- Aydin, F., Gümüşsoy, K. S., Atabay, H. I., Iça, T., Abay, S. 2007. "Prevalence and Distribution of *Arcobacter* Species in Various Sources in Turkey and Molecular Analysis of Isolated Strains by ERIC-PCR." *Journal of Applied Microbiology* 103 (1): 27-35.
- Cervenka, L. 2007. "Survival and Inactivation of *Arcobacter* Spp., a Current Status and Future Prospect." *Critical Reviews in Microbiology* 33: 101-108.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2015. *Performance Standards for Antimicrobial*, CLSI document M100-S25.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P., Figueras, M. J. 2009. "*Arcobacter mytili* Sp. Nov., an Indoxyl Acetate-Hydrolysis-Negative Bacterium Isolated from Mussels." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 1391-1396.
- Collado, L., Figueras, M. J. 2011. "Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*." *Clinical Microbiology Reviews* 24 (1): 174-192.
- Collado, L., Guarro, J., Figueras, M. J. 2009. "Prevalence of *Arcobacter* in Meat and Shellfish." *Journal of Food Protection* 72 (5): 1102-1106.
- Collado, L., Gutiérrez, M., González, M., Fernández, H. 2013. "Assessment of the Prevalence and Diversity of Emergent *Campylobacteria* in Human Stool Samples Using a Combination of Traditional and Molecular Methods." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 75 (4): 434-436.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., Figueras, M. J. 2008. "Presence of *Arcobacter* Spp. in Environmental Waters Correlates with High Levels of Fecal Pollution." *Environmental Microbiology* 10 (6): 1635-1640.

- Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, Josep M., Figueras, M. J. 2010. "Occurrence and Diversity of *Arcobacter* Spp. along the Llobregat River Catchment, at Sewage Effluents and in a Drinking Water Treatment Plant." *Water Research* 44 (12): 3696-3702.
- Collado, L., Levican, A., Perez, J., Figueras, M. J. 2011. "*Arcobacter defluvii* Sp. Nov., Isolated from Sewage Samples." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 2155-2161.
- D'Sa, E. M., Harrison, M. A. 2005. "Effect of pH, NaCl Content, and Temperature on Growth and Survival of *Arcobacter* Spp." *Journal of Food Protection* 68 (1): 18-25.
- de Boer, E., Tilburg, J. J., Woodward, D. L., Lior, H., Johnson, W. M. 1996. "A Selective Medium for the Isolation of *Arcobacter* from Meats." *Letters in Applied Microbiology* 23 (1): 64-66.
- de Oliveira, S.J., Baetz, A.L., Wesley, I.V., Harmon, K.M. 1997. "Classification of *Arcobacter* Species Isolated from Aborted Pig Fetuses and Sows with Reproductive Problems in Brazil." *Veterinary Microbiology* 57 (4): 347-354.
- De Smet, S., De Zutter, L., Van Hende, J., Houf, K. 2010. "*Arcobacter* Contamination on Pre- and Post-Chilled Bovine Carcasses and in Minced Beef at Retail." *Journal of Applied Microbiology* 108 (1): 299-305.
- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L., Houf, K. 2011. "*Arcobacter trophiarum* Sp. Nov., Isolated from Fattening Pigs." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 (2): 356-361.
- Debruyne, L., Gevers, D., Vandamme, P. 2008. *Taxonomy of the Family Campylobacteraceae*. Edited by Martin J. Blaser, Irving Nachamkin, and Christine M. Szymanski. 3rd ed. American Society of Microbiology, Washington, DC.
- diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.
- Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S. L. W., and M. Alam. 2005. "*Arcobacter halophilus* Sp. Nov., the First Obligate Halophile in the Genus *Arcobacter*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1271-1277.
- Doudah, L., De Zutter, L., Baré, J., Houf, K. 2014. "Towards a Typing Strategy for *Arcobacter* Species Isolated from Humans and Animals and Assessment of the *in Vitro* Genomic Stability." *Foodborne Pathogens and Disease* 11 (4): 272-280.
- Doudah, L., De Zutter, L., Vandamme, P., Houf, K. 2010. "Identification of Five Human and Mammal Associated *Arcobacter* Species by a Novel Multiplex-PCR Assay." *Journal of Microbiological Methods* 80: 281-286.
- Ellis, W., Neill, S., O'Brien, J., Ferguson, H., Hanna, J. 1977. "Isolation of Spirillum/Vibrio-like Organisms from Bovine Fetuses." *Veterinary Record* 100 (21): 451-452.
- Ellis, W., Neill, S., O'Brien, J., Hanna, J. 1978. "Isolation of Spirillum-like Organisms from Pig Fetuses." *Veterinary Record* 102 (5): 106.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility (EUCAST), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2000. "Determination of Minimum

- Inhibitory Concentrations (MICs) of Antibacterial Agents by Agar Dilution.” *Clinical Microbiology and Infection* 6 (9): 509-515.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint (EUCAST) 2016. Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters”
- Fera, M. T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D., Pennisi, M. G. 2009. “Pet Cats as Carriers of *Arcobacter* Spp. in Southern Italy.” *Journal of Applied Microbiology* 106 (5): 1661-1666.
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Giannone, M., Gugliandolo, C., La Camera, E., Blandino, G., Carbone M. 2003. “In Vitro Susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to Different Antimicrobial Agents.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 21 (5): 488-491.
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., La Camera, E., Carbone, M., Giannone, M. 2004. “Detection of *Arcobacter* Spp. in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea.” *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3): 1271-1276.
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo C., La Camera, E., Lentini, V., Favaloro, A., Bonanno, D., Carbone, M. 2008. “Induction and Resuscitation of Viable Nonculturable *Arcobacter butzleri* Cells.” *Applied and Environmental Microbiology* 74 (10): 3266-3268.
- Fera, M. T., Russo, G., T., Di Benedetto, A., La Camera, E., Orlando, A., Giandalia, A., Ruffa, V., F. 2010. “High Prevalence of *Arcobacter* Carriage in Older Subjects with Type 2 Diabetes.” *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 489784
- Fernandez, H., Vera, F., Villanueva, M., P. 2007. “*Arcobacter* and *Campylobacter* Species in Birds and Mammals from Southern Chile.” *Archivos De Medicina Veterinaria* 39 (2): 163-165.
- Ferreira, S., Fraqueza, M.J., Queiroz, J.A, Domingues, F.C., Oleastro, M. 2013. “Genetic Diversity, Antibiotic Resistance and Biofilm-Forming Ability of *Arcobacter butzleri* Isolated from Poultry and Environment from a Portuguese Slaughterhouse.” *International Journal of Food Microbiology* 162 (1): 82-88.
- Ferreira, S., Júlio, C., Queiroz, J.A, Domingues, F.C., Oleastro, M. 2014. “Molecular Diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in Diarrhoeal Samples among Portuguese Patients.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 78 (3): 220-225.
- Ferreira, S., Oleastro, M., Domingues, F.C. 2016. “*Arcobacter* Spp. in Food Chain - From Culture to Omics.” In *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, Edited by Om V. Singh, First Edit, New York 73-177.
- Ferreira, S., Queiroz, J.A, Domingues, F.C., Oleastro, M. 2015. “Insights in the Pathogenesis and Resistance of *Arcobacter* : A Review.” *Critical Reviews in Microbiology* 7828: 1-20.
- Figueras, M.J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J., Yustes, C. 2011. “*Arcobacter molluscorum* Sp. Nov., a New Species Isolated from Shellfish.” *Systematic and Applied Microbiology* 34 (2): 105-109.
- Figueras, M.J., Levican, A., Collado, L., Inza, M.I., Yustes, C. 2011. “*Arcobacter ellisii* Sp. Nov., Isolated from Mussels.” *Systematic and Applied Microbiology* 34 (6): 414-418.

- Fong, T.T., Mansfield, L.S., Wilson, D.L., Schwab, D.J., Molloy, S.L., Rose, J.B.. 2007. "Massive Microbiological Groundwater Contamination Associated with a Waterborne Outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio." *Environmental Health Perspectives* 115 (6): 856-864.
- Giacometti, F., Lucchi, A., Di Francesco, A., Delogu, M., Grilli, E., Guarniero, I., Stancampiano, L., Manfreda, G., Merialdi, G., Serraino, A. 2015. "*Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* Circulation in a Dairy Farm and Sources of Milk Contamination." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (15): 5055-5063.
- Giacometti, F., Serraino, A., Marchetti, G., Bonerba, E., Florio, D. Bonfante, E., Zanoni, R.G. 2010. "Isolation of *Arcobacter Butzleri* in Environmental and Food Samples Collected in Industrial and Artisanal Dairy Plants" 2: 121-123.
- Giacometti, F., Serraino, A., Pasquali, F., De Cesare, A., Bonerba, E., Rosmini, R. 2014. "Behavior of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in Ultrahigh-Temperature, Pasteurized, and Raw Cow's Milk Under Different Temperature Conditions." *Foodborne Pathogens and Disease* 11 (1): 15-20.
- González, A., Botella, S., Montes, R.M., Moreno, Y., Ferrús, M.A. 2007. "Direct Detection and Identification of *Arcobacter* Species by Multiplex PCR in Chicken and Wastewater Samples from Spain." *Journal of Food Protection* 70 (2): 341-347.
- González, A., Ferrús, M.A. 2011. "Study of *Arcobacter* Spp. Contamination in Fresh Lettuces Detected by Different Cultural and Molecular Methods." *International Journal of Food Microbiology* 145 (1): 311-314.
- González, A., Moreno, Y., González, R., Hernández, J. Ferrús, M.A. 2006. "Development of a Simple and Rapid Method Based on Polymerase Chain Reaction-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis to Differentiate *Helicobacter*, *Campylobacter*, and *Arcobacter* Species." *Current Microbiology* 53 (5): 416-421.
- González, I., Fernández-Tomé, S., García, T., Martín, R. 2014. "Genus-Specific PCR Assay for Screening *Arcobacter* Spp. in Chicken Meat." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (6): 1218-1224.
- González, I., García, T., Fernández, S., Martín, R. 2012. "Current Status on *Arcobacter* Research: An Update on DNA-Based Identification and Typing Methodologies." *Food Analytical Methods* 5 (5): 956-968.
- Grove-White, D.H., Leatherbarrow, A.J.N., Cripps, P.J., French, N.P. 2014. "Temporal and Farm-Management-Associated Variation in the Faecal-Pat Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Ruminants." *Epidemiology & Infection* 138 (4): 549-558.
- Hamill, S., D Neill, S., Madden, R.H. 2008. "A Comparison of Media for the Isolation of *Arcobacter* Spp. from Retail Packs of Beef." 71 (4): 850-854.
- Hamir, A.N., Sonn, R.J., Franklin, S., Wesley, I.V. 2004. "*Campylobacter jejuni* and *Arcobacter* Species Associated with Intussusception in a Raccoon (*Procyon Lotor*)." *Veterinary Record* 155 (11): 338-340.
- Hanna, S.E., Christopher, J., Connor, J., Wang, H.H. 2005. "Real-Time Polymerase Chain

- Reaction for the Food Microbiologist : Technologies , Applications , and Limitations.” *J Food Sci* 70: 49-53.
- Harmon, K.M., Wesley, I.V. 1996. “Identification of *Arcobacter* Isolates by PCR” *Letters in Applied Microbiology*, 23(4): 241-244.
- Harrass, B., Schwarz, S., Wenzel, S. 1998. “Identification and Characterization of *Arcobacter* Isolates from Broilers by Biochemical Tests, Antimicrobial Resistance Patterns and Plasmid Analysis.” *Journal of Veterinary Medicine* 45 (2): 87-94.
- Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K., Fröhling, A., Schlüter, O., Klocke, M. 2013. “Occurrence and Genetic Diversity of *Arcobacter* Spp. in a Spinach-Processing Plant and Evaluation of Two *Arcobacter*-Specific Quantitative PCR Assays.” *Systematic and Applied Microbiology* 36 (4): 235-243.
- Hilton, C.L., Mackey, B. M., Hargreaves, A. J., Forsythe, S. J. 2001. “The Recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from Various Temperature Treatments.” *Journal of Applied Microbiology* 91 (5): 929-932.
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Gaastra, W. 2006. “*Arcobacter*, What Is Known and Unknown about a Potential Foodborne Zoonotic Agent!” *Veterinary Microbiology* 115 (1-3): 1-13.
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Gaastra, W. 2008. “The Introduction of *Arcobacter* Spp. in Poultry Slaughterhouses.” *International Journal of Food Microbiology* 125 (3): 223-229.
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Van Der Graaf-Van Bloois, L., Van Bergen, M., Gaastra, W. 2006. “Potential Routes of Acquisition of *Arcobacter* Species by Piglets.” *Veterinary Microbiology* 114 (1-2): 123-133.
- Houf, K., De Smet, S., Baré, J., Daminet, S. 2008. “Dogs as Carriers of the Emerging Pathogen *Arcobacter*.” *Veterinary Microbiology* 130 (1-2): 208-213.
- Houf, K., De Zutter, L., Van Hoof, J., Vandamme, P. 2002. “Assessment of the Genetic Diversity among *Arcobacters* Isolated from Poultry Products by Using Two PCR-Based Typing Methods Assessment of the Genetic Diversity among *Arcobacters* Isolated from Poultry Products by Using Two PCR-Based Typing Methods.” *Applied and Environmental Microbiology* 68 (5): 2172-2178.
- Houf, K., Devriese, L.A., De Zutter, L., Hoof, J. V.. 2001b. “Development of a New Protocol for the Isolation and Quantification of *Arcobacter* Species from Poultry Products.” *International Journal of Food Microbiology* 71(2-3):189-196
- Houf, K., Devriese, L.A., De Zutter, L., Van Hoof, J., Vandamme, P. 2001a. “*Arcobacter skirrowii* to Antimicrobial Agents Used in Selective Media.” *Journal of Clinical Microbiology* 39 (4): 1654-1656.
- Houf, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.P, Van Hoof, J. Vandamme, P. 2004. “Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* Strains Isolated from Humans and Broilers.” *Microbial Drug Resistance* 10 (3): 243-247.
- Houf, K., On, S.L.W., Coenye, T., Debruyne, T., De Smet, S. Vandamme, P. 2009. “*Arcobacter thereius* Sp. Nov., Isolated from Pigs and Ducks.” *International Journal of Systematic and*

- Evolutionary Microbiology* 59 (10): 2599-2604.
- Houf, K., On, S.L.W., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J., Vandamme, P. 2005. "Arcobacter cibarius Sp. Nov., Isolated from Broiler Carcasses." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (2): 713-717.
- Houf, K., Stephan, R. 2007. "Isolation and Characterization of the Emerging Foodborn Pathogen *Arcobacter* from Human Stool." *Journal of Microbiological Methods* 68 (2): 408-413.
- Houf, K., Tutenel, A., De Zutter, L., Van Hoof, J., Vandamme, P. 2000. "Development of a Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection and Identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*" *FEMS Microbiology Letters* 193 (1): 89-94.
- Hsu, T.-T. D., Lee, J. 2015. "Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water." *Zoonoses and Public Health* 62 (8): 579-589
- Hsueh, P. R., Teng, L. J., Yang, P. C., Wang, S. K., Chang, S. C., Ho, S. W., Hsieh, W. C., Luh, K. T. 1997. "Bacteremia Caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B." *Journal of Clinical Microbiology* 35 (2): 489-491.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2002. *Microorganisms in Food. 7 - Microbiological Testing in Food Safety Management*. Springer Science and Business Media.
- Jacob, J., Woodward, D., Feuerpfel, I., Johnson, W.M. 1998. "Isolation of *Arcobacter butzleri* in Raw Water and Drinking Water Treatment Plants in Germany." *Zentralblatt Fur Hygiene Und Umweltmedizin* 201(2):189-198
- Jiang, Z. D., Dupont, H.L., Brown, E.L., Nandy, R.K., Ramamurthy, T., Sinha, A., Ghosh, S., Guin, S., Gurleen, K., Rodrigues, S., Chen, J.J., McKenzie, R., Steffen, R. 2010. "Microbial Etiology of Travelers' Diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: Importance of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* Species." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (4): 1417-1419.
- Johnson, L. G., Murano, E.A. 1999. "Comparison of Three Protocols for the Isolation of *Arcobacter* from Poultry." *Journal of Food Protection* 62 (6): 610-614.
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C.M., Steigerwalt, A. G., Wachsmuth, I.K. 1991. "*Campylobacter-butzi* Sp-Nov Isolated from Humans and Animals with Diarrheal Illness." *Journal of Clinical Microbiology* 29 (2): 376-385.
- Kim, H. M., Hwang, C.Y., Cho, B.C. 2010. "*Arcobacter marinus* Sp. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (3): 531-536.
- Kopilović, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M., Kraigher, A. 2008. "Waterborne Outbreak of Acute Gastroenteritis in a Costal Area in Slovenia in June and July 2008." *Euro Surveillance* 13 (34): 7-9.
- Kownhar, H., Shankar, E.M., Rajan, R., Vengatesan, A., Rao, U.A. 2007. "Prevalence of *Campylobacter jejuni* and Enteric Bacterial Pathogens among Hospitalized HIV Infected versus Non-HIV Infected Patients with Diarrhoea in Southern India." *JOUR. Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 39 (10). 862-866.

- Lastovica, A. J., On, S. L. W., Zhang, L. 2014. "The Family Campylobacteraceae." In *The Prokaryotes - Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria*. 307-335
- Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Teng, J.L.L., Leung, K.W., Yuen, K.Y. 2002. "Identification by 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing of *Arcobacter butzleri* Bacteraemia in a Patient with Acute Gangrenous Appendicitis." *Molecular Pathology* : 55 (3): 182-185.
- Lee, M.H., Cheon, D-S., Choi,S., Lee, B-H., Jung, J.-Y., Choi, C. 2010. "Prevalence of *Arcobacter* Species Isolated from Retail Meats in Korea." *Journal of Food Protection* 73 (7): 1313-1316.
- Lehmann, D., Alter, T. 2015. "Prevalence , Virulence Gene Distribution and Genetic Diversity of *Arcobacter* in Food Samples in Germany and Genetic Diversity of *Arcobacter* in Food" *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 128(3-4):163-168.
- Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R. 2005. "Relevant Aspects of *Arcobacter* Spp. as Potential Foodborne Pathogen." *International Journal of Food Microbiology* 102 (2): 127-135.
- Levican, A., Alkeskas, A., Günter, C., Forsythe, S.J, Figueras, M.J. 2013. "Adherence to and Invasion of Human Intestinal Cells by *Arcobacter* Species and Their Virulence Genotypes." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (16): 4951-4957.
- Levican, A., Collado, L., Aguilar,C., Yustes,C., Diéguez, A.L, Romalde,J.L Figueras, M.J. 2012. "*Arcobacter bivalviorum* Sp. Nov. and *Arcobacter Venerupis* Sp. Nov., New Species Isolated from Shellfish." *Systematic and Applied Microbiology* 35 (3): 133-138.
- Levican, A., Collado, L., Yustes, C., Aguilar, C., Figueras, M.J. 2014. "Higher Water Temperature and Incubation under Aerobic and Microaerobic Conditions Increase the Recovery and Diversity of *Arcobacter* Spp. from Shellfish." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (1): 385-391.
- Levican, A., Collado,L., Figueras, M.J. 2013. "*Arcobacter cloacae* Sp. Nov. and *Arcobacter suis* Sp. Nov., Two New Species Isolated from Food and Sewage." *Systematic and Applied Microbiology* 36 (1): 22-27.
- Levican, A., Figueras, M.J. 2013. "Performance of Five Molecular Methods for Monitoring *Arcobacter* Spp." *BMC Microbiology* 13: 220.
- Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martinez-Murcia, A., Collado, L., Figueras, M.J. 2015. "*Arcobacter ebronensis* Sp. Nov. and *Arcobacter aquimarinus* Sp. Nov., Two New Species Isolated from Marine Environment." *Systematic and Applied Microbiology* 38 (1): 30-35.
- Lipman, L., Ho, H., Gaastra, W. 2008. "The Presence of *Arcobacter* Species in Breeding Hens and Eggs from These Hens." *Poultry Science* 87 (11): 2404-2407.
- Logan, E., Neill, S., Mackie, D. 1982. "Mastitis in Dairy Cows Associated with an Aerotolerant Campylobacter." *Veterinary Record* 110 (10). 229-230.
- Mansfield, L.P., Forsythe, S.J. 2000. "*Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus* - Potential Emerging Human Pathogens." *Reviews in Medical Microbiology* 11 (3): 161-170.
- Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Carbone, M., Caccamo, D., Fera, M. T. 2000. "Isolation of *Arcobacter* Spp. from a Brackish Environment." *New Microbiologica* 23 (2): 143-149.
- McClung, C.R., Patriquin, D.G., Davis, R.E. 1983. "*Campylobacter nitrofigilis* Sp . Nov ., a

- Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Roots of *Spartina alterniflora* Loisel.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 33 (July): 605-612.
- Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J. H., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C. A., Miller, W. G., Williams, N. J. 2011. “Comparison of *Arcobacter* Isolation Methods, and Diversity of *Arcobacter* Spp. in Cheshire, United Kingdom.” *Applied and Environmental Microbiology* 77 (5): 1646-1650.
- Merga, J.Y., Williams, N.J., Miller, W.G., Leatherbarrow, A.J.H., Bennett, M., Hall, N., Ashelford, K.E, Winstanley, C. 2013. “Exploring the Diversity of *Arcobacter butzleri* from Cattle in the UK Using MLST and Whole Genome Sequencing.” *PLoS ONE* 8 (2): e55240.
- Miller, W. G., Parker, C.T., Rubenfield, M., Mendz, G.L., Wösten, M.M.S.M., Ussery, D.W., Stolz, J.F., Binnewies, T.T., Hallin, P.F., Wang, G. “The Complete Genome Sequence and Analysis of the Epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*.” *PLoS ONE* 2 (12): e1358.
- Mottola, A., Bonerba, E., Bozzo, G., Marchetti, P., Vitale, G., Colao, V., Terio, V., Tantillo, G., Figueras, M. J., Di, A. 2016. “Occurrence of Emerging Food-Borne Pathogenic *Arcobacter* Spp. Isolated from Pre-Cut (Ready-to-Eat) Vegetables.” *International Journal of Food Microbiology* 236: 33-37.
- Oliveira, S. J., Ikuta, N., Lunge, V.R., Fonseca, A., Moraes, H. L., Kuchenbecker, B.S., Passos, D.T. 2003. “Isolamento de *Arcobacter butzleri* de Músculos de Carcaças de Suínos de Terminação E de Matrizes Descartadas Abatidos Em Um Matadouro No Estado Do Rio Grande Do Sul, Brasil.” *Ciência Rural* 33 (5): 889-892.
- On, S. L. W., Harrington, C. S., Atabay, H. I. 2003. “Differentiation of *Arcobacter* Species by Numerical Analysis of AFLP Profiles and Description of a Novel *Arcobacter* from Pig Abortions and Turkey Faeces.” *Journal of Applied Microbiology* 95 (5): 1096-1105.
- On, S. L. W., Stacey, A., Smyth, J. 1995. “Isolation of *Arcobacter butzleri* from a Neonate with Bacteraemia.” *Journal of Infection* 31 (3): 225-227.
- Pejchalová, M., Vytrasova, J., Brozkova, I., Huskova, Z., Cervenka, L. 2006. “Occurrence of *Arcobacters* in the Czech Republic and the Influence of Sample Matrix on Their Detection Using PCR.” *Journal of Food and Nutrition Research* 45 (4): 152-158.
- Pentimalli, D., Pegels, N., García, T., Martín, R., González, I. 2009. “Specific PCR Detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in Chicken Meat.” *Journal of Food Protection* 72 (7): 1491-1495.
- Rahimi, E. 2014. “Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Arcobacter* Species Isolated from Poultry Meat in Iran.” *British Poultry Science* 55(2): 37-41.
- Rantsiou, K., Lamberti, C., Cocolin, L. 2010. “Survey of *Campylobacter jejuni* in Retail Chicken Meat Products by Application of a Quantitative PCR Protocol.” *International Journal of Food Microbiology* 141: S75-79.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H., Tanner, S. A. 1999. “Isolation of *Arcobacter Butzleri* from Ground Water.” *Letters in Applied Microbiology* 28 (1): 31-35.
- Ridsdale, J. A., Atabay, H. I., Corry, J.E.L. 1998. “Prevalence of *Campylobacters* and *Arcobacters* in Ducks at the Abattoir.” *Journal of Applied Microbiology* 85 (3): 567-573.

- Rivas, L., Fegan, N., Vanderlinde, P. 2004. "Isolation and Characterisation of *Arcobacter butzleri* from Meat." *International Journal of Food Microbiology* 91 (1): 31-41.
- Samie, A., Obi, C.L., Barrett, L.J.S., Powell, M.,Guerrant, R.L 2007. "Prevalence of *Campylobacter* Species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* Species in Stool Samples from the Venda Region, Limpopo, South Africa: Studies Using Molecular Diagnostic Methods." *The Journal of Infection* 54 (6): 558-566.
- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E.V.V., Sasikala, C., Ramana, C.V. 2013. "*Arcobacter anaerophilus* Sp. Nov., Isolated from an Estuarine Sediment and Emended Description of the Genus *Arcobacter*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 4619-4625.
- Scarano, C., Giacometti, F., Manfreda, G., Lucchi, A., Pes, E., Spanu,C., Pietro,R., and Luigi De Santis, E.P.L, Serraino, A. 2014. "*Arcobacter butzleri* in Sheep Ricotta Cheese at Retail and Related Sources of Contamination in an Industrial Dairy Plant" 80 (22): 7036-7041.
- Schroeder-Tucker, L., Wesley, I. V., Kiehlbauch, J.A., Larson, D.J., Thomas, L. A., Erickson, G.A. 1996. "Phenotypic and Ribosomal RNA Characterization of *Arcobacter* Species Isolated from Porcine Aborted Fetuses." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8 (2): 186-195.
- Scullion, R., Harrington,C.S., Madden, R.H. 2004. "A Comparison of Three Methods for the Isolation of *Arcobacter* Spp . from Retail Raw Poultry in Northern Ireland" *Journal of Food Protection* 67 (4): 799-804.
- Serraino, A., Giacometti, F. 2014. "Occurrence of *Arcobacter* Species in Industrial Dairy Plants." *Journal of Dairy Science* 97 (4): 2061-2065.
- Shah, A. H., Saleha, A.A, Murugaiyah, Aliyu, A. B., Jafri, N. 2012. "Prevalence, Distribution and Antibiotic Resistance of Emergent *Arcobacter* Spp. from Clinically Healthy Cattle and Goats." *Transboundary and Emerging Diseases* 60 (1): 9-16.
- Shah, A. H., Saleha, A.A, Murugaiyah, M., Zunita, Z., Memon, A.A. 2012a. "Prevalence and Distribution of *Arcobacter* Spp. in Raw Milk and Retail Raw Beef." *Journal of Food Protection* 75 (8): 1474-1478.
- Šilha, D., Šilhová-Hrušková, L., Vytřasová, J. 2015. "Modified Isolation Method of *Arcobacter* Spp. from Different Environmental and Food Samples." *Folia Microbiologica* 60 (6): 515-521.
- Son, I., Englen, M.D., Berrang, M.E., Fedorka-Cray, P.J, Harrison, M.A. 2007. "Antimicrobial Resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from Broiler Carcasses." *International Journal of Antimicrobial Agents* 29 (4): 451-455.
- Tabatabaei, M., Aski, H.S., Shayegh, H., Khoshbakht, R. 2014. "Occurrence of Six Virulence-Associated Genes in *Arcobacter* Species Isolated from Various Sources in Shiraz, Southern Iran." *Microbial Pathogenesis* 66: 1-4.
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Van Hende, J., Houf, K. 2014. "Prevalence of *Arcobacter* Species among Humans, Belgium, 2008-2013." *Emerging Infectious Diseases* 20 (10): 1731-1734.

- Van Driessche, E., Houf, K. 2007a. "Discrepancy between the Occurrence of *Arcobacter* in Chickens and Broiler Carcass Contamination." *Poultry Science* 86 (4): 744-751.
- Van Driessche, E., Houf, K. 2007b. "Characterization of the *Arcobacter* Contamination on Belgian Pork Carcasses and Raw Retail Pork." *International Journal of Food Microbiology* 118 (1): 20-26.
- Van Driessche, E., Houf, K., Van Hoof, J., De Zutter, L., Vandamme, P. 2003. "Isolation of *Arcobacter* Species from Animal Feces." *FEMS Microbiology Letters* 229 (2): 243-248.
- Van Driessche, E., Houf, K., Vangroenweghe, F., De Zutter, L., Van Hoof, J. 2005. "Prevalence, Enumeration and Strain Variation of *Arcobacter* Species in the Faeces of Healthy Cattle in Belgium." *Veterinary Microbiology* 105 (2): 149-154.
- Vandamme P., Giesendorf B.A, van Belkum A., Pierard D., Lauwers S., Kersters K., Butzler J.P., Goossens, H., Quint, W.G. 1993. "Discrimination of Epidemic and Sporadic Isolates of *Arcobacter* Butzleri by Polymerase Chain Reaction-Mediated DNA Fingerprinting." *Journal of Clinical Microbiology* 31 (12): 3317-3319.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., De Ley, J. 1991. "Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter* Gen. Nov." *International Journal of Systematic Bacteriology* 41 (1): 88-103.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H., Lauwers, S.. 1992. "Outbreak of Recurrent Abdominal Cramps Associated with *Arcobacter* Butzleri in an Italian School." *Journal of Clinical Microbiology* 30 (9): 2335-2337.
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J. 1992. "Polyphasic Taxonomic Study of the Emended Genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* Comb. Nov. and *Arcobacter skirrowii* Sp. Nov., an Aerotolerant Bacterium Isolated from Veterinary Specimens." *International Journal of Systematic Bacteriology* 42 (3): 344-356.
- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J. P., Vandamme, P. 2004. "*Arcobacter* Species in Humans." *Emerging Infectious Diseases* 10 (10): 1863-1867.
- Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J.P., Dediste, A. 2006. "Antimicrobial Susceptibility of Clinical Isolates of Non-*Jejunicola* Campylobacters and Arcobacters from Belgium." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57 (5): 908-913.
- Villalobos, E. G., Jaramillo, H.F., Ulate, C.C., Echandi, M.L.A. 2013. "Isolation and Identification of Zoonotic Species of Genus *Arcobacter* from Chicken Viscera Obtained from Retail Distributors of the Metropolitan Area of San José, Costa Rica." *Journal of Food Protection* 76 (5): 879-882.
- Villaruel-López, A., Márquez-González, M., Garay-Martínez, L.E., Zepeda, H., Castillo, A., Mota de la Garza, L., Murano, E.A., Torres-Vitela, R.. 2003. "Isolation of *Arcobacter* Spp . from Retail Meats and Cytotoxic Effects of Isolates against Vero Cells," *Journal of Food*

Protection 66(8): 1374-1378

- Wesley, I. V., Miller, G. W. 2010. "Arcobacter: An Opportunistic Human Food-Borne Pathogen." In Emerging Infections 9, edited by Scheld, W.M., Grayson, M.L., Hughes, J.M., ninth ed., Washington, DC.
- Wesley, I. V., Schroeder-Tucker, L., Baetz, A. L., Dewhirst, F. E., Paster, B.J. 1995. "rRNA-Based DNA Probes." *Journal of Clinical Microbiology* 33 (7): 1691-1698.
- Wesley, I.V., L. Schroeder-Tucker, L., Franklin. 2003 "Recovery of *Arcobacter* Spp. from Exotic Animal Species." *International Journal of Medical Microbiology* 253: 54.
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J. Cloutier, M., Tambong, J.T., Xu, R., Topp, E., Arts, M.T., Chao, J., Adam, z., Lévesque, C.A., Lapen, D.R., Villemur, R., Talbot, G., Khan, I.U.H. 2015. "*Arcobacter lanthieri* Sp. Nov., Isolated from Pig and Dairy Cattle Manure." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (8): 2709-2016.
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J.T., Xu, R., Topp, E., Arts, M.T., Chao, J., Adam, z., Lévesque, C.A., Lapen, D.R., Villemur, R., Talbot, G., Khan, I.U.H. 2016. "Identification, Characterization and Description of *Arcobacter faecis* Sp. Nov., Isolated from a Human Waste Septic Tank." *Systematic and Applied Microbiology* 39 (2): 1-7
- World Health Organization (WHO), 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne
- Yan, J.J., Ko, W.C., Huang, A.H., Chen, H.M., Jin, Y.T., Wu, J.J. 2000. "*Arcobacter butzleri* Bacteremia in a Patient with Liver Cirrhosis." *Journal of the Formosan Medical Association* 99(2): 166–169.
- Yildiz, H., Aydin, S. 2006. "Pathological Effects of *Arcobacter cryaerophilus* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss Walbaum*)." *Acta Veterinaria Hungarica* 54: 191-199
- Zacharow, I., N, J.B.B., B, E.w, Podkowik, M., Bania, J. 2015. "Genetic Diversity and Incidence of Virulence-Associated Genes of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* Isolates from Pork , Beef , and Chicken Meat in Poland" *BioMed Research International*: 956507
- Zhang, Z., Yu, C., Wang, X., Yu,S., Zhang, X.-H. 2015. "*Arcobacter pacificus* Sp . Nov ., Isolated from Seawater of the South Pacific Gyre." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 542-547

Anexos



Anexo 1: Prémio de melhor comunicação oral de aluno de mestrado no XI Annual CICS-UBI Symposium